


VNIVERSITAT  VALÈNCIA

*Àl·lodeu | cœd^Á^âããUâ[ } q [| \* ãe  
Ä^] æcæ ^} oâ^Á^âããUâ•c dãããOâ^& [| \* ãe*



## NUEVAS POSIBILIDADES TERAPÉUTICAS EN EL FALLO DE IMPLANTACIÓN

### TESIS DOCTORAL

Presentada por: Sevkiye Tugce Pehlivan Budak

Dirigida por: Dra. Carmen Rubio Lluesa y Dr. Carlos Simón Vallés

Para acceder al grado de doctor en Medicina



El presente trabajo de tesis doctoral ha sido realizado  
en las siguientes instalaciones y laboratorios:

**Instituto Universitario IVI (IUIVI)**

~~Última actualización~~



**IGENOMIX**

~~Última actualización~~





Ö'æZÖæ{ ^} ÁÛ~ àã Å|~ ^•æ  
Öã^&q |æã^Åæ[ |æ[ |ã ÁÕÜZÖÒòPUT QÁ

ÔòÜvøøUkÁ

Que D<sup>a</sup> Sevkiye Tugce Pehlivan Budak ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación que ha dado lugar a la memoria titulada: “Nuevas posibilidades terapéuticas en el fallo de implantación”.

Ö&.Öá ^{ [ |ãÁ•a Á[ ] &| ãæÁÁ^Á[ ] •ã^|æãæ çá çæã ~ Á^&c |æÁ Á^~ } •æ| gà|ææ Æ

Xæ{ } &ãZU&c à|^Á^ÁÇFÍ Á

Øã[ KÖra. Carmen Rubio Lluesa



Ôæ|| •ÁÛ 5} ÁXæ||..•ÉÚ!| ^•[ !ÁVã |æÁá^|ÁÖ^] ææ ^} q Áá^ÁÚ^áãæ àÉÚà•c^dææÁ Á  
Õã ^&| [| \*æá^ÁæÖæ |æáÁ^Á^áãæ æá^Áæ^} &ãÁ

ÔòÜVøÖUÁ

Que D<sup>a</sup> Sevkiye Tugce Pehlivan Budak ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación que ha dado lugar a la memoria titulada: “Nuevas posibilidades terapéuticas en el fallo de implantación”.

Öæ.æÁ ^{ [ !ãÁ•a Á | } &| ãæÁ Á^Á | } •ã^!æææ æá ææÁ ~ Á^&c^!æÁ Á^~ } •æá gá|ææ È

Xæ^} &ãÉÚ&c^ à!^Á^ÁæFí Á

øá| KÖ!ÉÖæ|| •ÁÛ 5} ÁXæ||..•Á





<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Implantación embrionaria</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Fallo repetido de implantación (FI)</b>	<b>4</b>
1.2.1. Las causas de fallo de implantación	5
<b>1.3. El cultivo embrionario prolongado</b>	<b>6</b>
<b>1.4. Diagnóstico genético preimplantacional (DGP)</b>	<b>7</b>
1.4.1. Hibridación <del>de</del> <sup>in</sup> situ fluorescente (FISH)	9
1.4.1.1. Limitaciones de PGS mediante FISH	9
1.4.2. Hibridación genómica comparada (CGH)	10
<b>1.5. Origen y etiología de las anomalías cromosómicas</b>	<b>12</b>
1.5.1. Tipos de aneuploidías	12
<b>1.6. Hipótesis de trabajo</b>	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>25</b>
<b>3.1. Diseño y selección de pacientes</b>	<b>27</b>
<b>3.2. Tratamiento</b>	<b>31</b>
3.2.1. Fecundación <del>de</del> <sup>in</sup> vitro (FIV)	31
3.2.2. La estimulación ovárica	31
3.2.3. Aspiración folicular – recuperación de los ovocitos	32
3.2.4. Preparación de los ovocitos y espermatozoides	33
3.2.5. La inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI)	33
3.2.6. Desarrollo embrionario	34
3.2.7. Cultivo prolongado	35
3.2.7.1. Co-cultivo endometrial	36
3.2.7.2. Cultivo secuencial	38
3.2.8. Transferencia embrionaria	38
<b>3.3. Procedimientos de diagnóstico genético preimplantacional (DGP)</b>	<b>39</b>
3.3.1. Biopsia embrionaria (en día 3)	39
3.3.1.1. Equipamiento para biopsia y fijación	40
3.3.2. Fijación de blastómeros e hibridación <del>de</del> <sup>in</sup> situ fluorescente (FISH)	41
3.3.2.1. Protocolo de FISH	42
3.3.2.2. Equipamiento para FISH	44
3.3.3. Array de CGH	45
3.3.3.1. Materiales	46
3.3.3.2. Metodología de array de CGH	49
<b>3.4. Análisis estadístico</b>	<b>52</b>



<b>4. RESULTADOS</b>	<b>55</b>
<b>4.1. Estudio randomizado de PGS-FISH en casos de fallo de implantación</b>	<b>57</b>
4.1.1. Resultados del ciclo de FIV y de anomalías cromosómicas	57
4.1.2. Resultados clínicos	59
<b>4.2. Estudio de PGS con array de CGH en casos de fallo de implantación</b>	<b>61</b>
4.2.1. Resultados en función de la edad materna	61
4.2.2. Resultados en función del número de fallos previos de FIV	62
4.2.3. Resultados en función de la concentración de espermatozoides	63
4.2.4. Resultados en función del número de ovocitos MII recuperados	64
<b>5. DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>67</b>
5.1. PGS y estudios usando la técnica FISH.	71
5.2. PGS y estudios usando la técnica array de CGH	76
5.3. PGS y estudios de secuenciación de nueva generación (NGS)	80
5.4. El ADN mitocondrial (mtDNA) como un biomarcador de la viabilidad del embrión	83
5.5. Receptividad endometrial	86
5.5.1. Daño mecánico endometrial (Endometrial scratching)	86
5.5.2. Array de receptividad endometrial (Endometrial Receptivity Array - ERA)	87
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>91</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>95</b>
<b>8. AGRADECIMIENTOS</b>	<b>119</b>



**%=BHFC8I 77=é B**



## 1.2. IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA

La implantación embrionaria es el proceso por el cual el embrión en fase de blastocisto se fija al endometrio materno para continuar su desarrollo intrauterino. Por ello, del correcto funcionamiento de esta fase depende en gran parte la continuidad de la especie en los mamíferos y, por tanto, del ser humano. La implantación embrionaria humana ocurre generalmente en el tercio medio y superior de la pared posterior del útero, y tiene lugar en un momento específico dentro del ciclo menstrual, denominado  $\zeta^{\wedge}\} \alpha \beta \alpha^{\wedge} \tilde{\alpha} \} / \alpha \beta \alpha \beta \} \tilde{\alpha}$  (Valbuena  $\alpha \beta \tilde{\alpha}$  1996). Este período comprende entre el sexto y el décimo día después de la ovulación, y debe coincidir con el desarrollo embrionario en estadio de blastocisto. La implantación transcurre en cuatro fases distintas, relacionadas y consecutivas, denominadas (Simón  $\alpha \beta \tilde{\alpha}$  1999):

1. Aposición: Durante la aposición, el blastocisto humano busca su lugar de implantación orientándose de forma específica con su masa celular interna en el polo por el que el trofoectodermo se va a adherir al epitelio endometrial superficial.
2. Adhesión: En la fase de adhesión, se produce el contacto directo entre el epitelio endometrial y el trofoectodermo del blastocisto, con lo que el embrión queda inicialmente pegado al útero. Ambas fases ocurren entre el sexto y el séptimo día después de la fertilización.
3. Rotura de la barrera epitelial: La rotura de la barrera epitelial (epitelio y membrana basal) es fundamental para que pueda progresar el blastocisto hacia el estroma endometrial.
4. Invasión: Durante la invasión, el trofoblasto embrionario penetra en el estroma e invade los vasos endometriales-miometriales reemplazando a las células endoteliales.

Todo este proceso está regulado por multitud de factores que actúan de forma sistémica (endocrina) o local (paracrina y autocrina), a nivel tanto endometrial como embrionario (Simón <sup>^</sup>1998). En la especie humana se ha descrito que en condiciones naturales alrededor del 30% de los embriones consiguen implantarse; es decir, fisiológicamente sólo un tercio de los ciclos considerados fértiles culmina en embarazo (Miller <sup>^</sup>1980). Las causas de esta baja tasa de éxito están compartidas entre el embrión, ya que in vivo el 30% de los blastocistos son morfológicamente anómalos en el momento de la implantación (Herting <sup>^</sup>1952), y un defectuoso diálogo entre el embrión y el endometrio materno, que representa otro 30%, observado en las pérdidas gestacionales precoces antes del momento de la menstruación (Wilcox <sup>^</sup>1988).

## 1.2. FALLO REPETIDO DE IMPLANTACIÓN (FI)

No existe todavía ninguna definición universalmente aceptada de fallo repetido de implantación (FI) o fallo de implantación recurrente (RIF), a pesar de muchas publicaciones sobre este tema. En pacientes que se someten a un ciclo de FIV, se define en aquellas con tres o más intentos sin éxito, o tras la transferencia de 10 o más embriones transferidos de buena calidad sin conseguir gestación. En otras palabras, fallo de implantación es una entidad clínica que se refiere a una situación en que la implantación ha fallado varias veces para llegar a una etapa gestacional reconocible por ecografía pélvica (Coughlan <sup>4</sup> ~~et al~~ 2014).

Debido a que la probabilidad de que un embrión se implante con éxito es alrededor de sólo 30%, la probabilidad de que no se implante es de aproximadamente el 70%. Sin embargo, después de la transferencia de dos embriones, la probabilidad de que no se implanten es de aproximadamente  $0,70^2 = 0,49$ . Tras la transferencia de 3, 4, 5 o 6 embriones, las probabilidades de que no se implante ninguna son de  $0,70^3 = 0,34$ ,  $0,70^4$



= 0,24,  $0,70^5 = 0,17$  y  $0,70^6 = 0,12$ , respectivamente.

### 1.2.1. Las causas del fallo de implantación

Las causas del fallo de implantación pueden ser múltiples y están poco definidas, y tanto factores endometriales como factores embrionarios e inmunológicos podrían estar implicados (Coughlan <sup>^</sup> ~~o~~ <sup>44</sup> 2014).

Los posibles factores responsables del fallo de implantación son:

1. Factores uterinos y alteraciones de la cavidad endometrial (miomas submucosos o intramurales, adenomiosis, pólipos, malformaciones müllerianas, sinecias, endometritis etc.).
2. Hidrosálpinx
3. Efecto negativo de los protocolos de estimulación y altos niveles de hormonas.
4. Técnica de transferencia (canal cervical tortuoso etc.).
5. Anomalías en los genes implicados en la implantación y defectos en el diálogo embrión-endometrio.
6. Defectos inmunológicos.
7. Problemas relacionados con el embrión y calidad embrionaria (morfológica y alteraciones genéticas).

Esta tesis se centra en el papel del embrión y, en concreto, en el aspecto cromosómico. Las alteraciones o anomalías cromosómicas embrionarias podrían ser responsables del fallo de implantación en algunas de estas parejas. A pesar de la importancia clínica de aneuploidías, sorprendentemente poco se conoce en relación con su impacto durante las primeras etapas del desarrollo humano. Existe diferencias en la progresión y la supervivencia de diferentes tipos de anomalías cromosómicas del ovocito

### 1.3. EL CULTIVO EMBRIONARIO PROLONGADO

El cultivo embrionario hasta el estadio de blastocisto también ha sido utilizado como un instrumento capaz de seleccionar los embriones con mayor probabilidad de implantación. En casos seleccionados, podemos mejorar las tasas de gestación con el

cultivo prolongado, pero para ello se hace necesario tener un buen número de embriones de buena calidad en día 3, que nos permita pensar que alguno de ellos podrá llegar a estadio de blastocisto y ser transferido. De hecho, las tasas de implantación y embarazo en pacientes con FI del programa de donación de óvulos de IVI fueron significativamente superiores en los ciclos en que se realizó la transferencia de blastocistos (el 32,7 y el 54,3%), respecto a las pacientes a quienes se realizó la transferencia en el segundo día de desarrollo embrionario (el 4,5 y el 13,3%) (Garrido <sup>14</sup> 2012). Sin embargo, los resultados de cultivo largo en las pacientes con FI y con sus propios ovocitos no fueron tan prometedores. Las tasas de implantación y de embarazo cuando se transfirieron blastocistos fueron del 11,9 y el 19,6%, respectivamente, frente al 10,7 y el 35% cuando las transferencias se realizaron en segundo día (Simón <sup>15</sup> 1999). Por otra parte, también se ha descrito un notable descenso de las tasas de implantación y embarazo en pacientes con ciclos repetidos de transferencia de blastocistos (Shapiro <sup>16</sup> 2001).

La realización de cultivo prolongado no es equiparable al ~~estudio~~ <sup>estudio</sup> lo sustituye. Aunque se sabe que los embriones con aneuploidías tienen mayor posibilidad de bloqueo durante la activación del genoma, no todas las anomalías cromosómicas son incompatibles con la formación del blastocisto. Por lo tanto, la realización de transferencias de blastocistos no nos asegura la normalidad cromosómica de estos embriones, y no es una herramienta para seleccionar embriones cromosómicamente normales.

#### 1.4. DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL

El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) se presenta como una forma muy precoz de diagnóstico que, apoyándose en las técnicas de reproducción asistida, hace posible el estudio genético en los embriones antes de ser transferidos al útero y, por tanto, antes de que se haya producido la implantación. Inicialmente, el DGP se ha

desarrollado gracias a los avances en las técnicas de reproducción asistida y la aplicación de las técnicas de biología para el estudio de anomalías génicas y cromosómicas, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la hibridación fluorescente (FISH) y las diferentes técnicas para el análisis de los 24 cromosomas, como el array de CGH. Desde entonces, el DGP ha resultado de gran utilidad en parejas con elevado riesgo de transmisión de enfermedades monogénicas a la descendencia, y para descartar anomalías cromosómicas numéricas y estructurales en el estadio embrionario preimplantacional, evitando la aplicación de interrupciones voluntarias del embarazo (Gianaroli <sup>^</sup>1999; Munné <sup>^</sup>2003; Munné <sup>^</sup>2006; Vidal <sup>^</sup>1998; Pellicer <sup>^</sup>1999; Rubio <sup>^</sup>2003; Pehlivan <sup>^</sup>2003; Harper <sup>^</sup>2010; De Rycke <sup>^</sup>2015; Moutou <sup>^</sup>2014; Dreesen <sup>^</sup>2014; Goossens <sup>^</sup>2012).

En los últimos 15 años, el diagnóstico genético se ha aplicado también como una herramienta adicional para la selección de embriones en varios grupos de pacientes, consideradas como de **Ía U`dfcbQghjWl** "En este sentido, se ha utilizado el DGP para la selección de embriones cromosómicamente normales para mejorar el pronóstico en mujeres edad avanzada ( $\geq 38$  años) (Munné <sup>^</sup>2003; Rubio <sup>^</sup>2005), en parejas con aborto recurrente de causa desconocida ( $>2$  abortos previos) (Pellicer <sup>^</sup>1999; Munné <sup>^</sup>2005; Rubio <sup>^</sup>2003; Rubio <sup>^</sup>2005), en parejas con factor masculino severo (Kahraman <sup>^</sup>2000; Rodrigo <sup>^</sup>2010) y en casos de fallo repetido de implantación (Rubio <sup>^</sup>2007; Pehlivan <sup>^</sup>2003). En estos casos se ha denominado PGS (del inglés, **Úl^ã ]|æ cæi } ÁÕ^ ^æÁÙ&'^^ } ã \*D** que podríamos traducir como Cribado Genético Preimplantacional. El DPG se permite la transferencia de los embriones caracterizados como sanos o cromosómicamente normales. Esta tecnología se utiliza hoy en día de forma sistemática en muchos centros de reproducción asistida.

#### 1.4.1. Hibridación *jb'g/h* fluorescente (FISH):

La técnica más utilizada hasta recientemente para el PGS había sido **la hibridación “in situ” fluorescente (FISH)** para un número limitado de cromosomas, siendo más frecuente el análisis de 9 cromosomas (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X e Y) que permitía la detección de aproximadamente el 83% de aneuploidías presentes en abortos espontáneos.

En esta técnica, el estudio cromosómico se realiza mediante FISH, que consiste en marcar los cromosomas con objeto del estudio con sondas fluorescentes de ADN específicas. A continuación, con el microscopio de fluorescencia, se puede identificar el número de copias para un cromosoma determinado. Habitualmente se estudian los cromosomas X, Y, 18, 13, 21, 16 y 22 en tres rondas de hibridación consecutivas (Vidal <sup>^ÁÉ</sup>1998). Con este análisis se diagnostica un tercio de la información cromosómica de estos embriones, lo que limita el éxito de la implantación cuando el error se sitúa en otro cromosoma que no se analiza y que producirá también un fallo de implantación.

##### 1.4.1.1. Limitaciones del PGS mediante FISH

En primer lugar, hay que tener en cuenta que la eficiencia de la hibridación de las sondas utilizadas para la FISH no es del 100%, esto implica que algunos de los embriones analizados se califiquen como no informativos para algunos de los cromosomas analizados y, por tanto, no puedan seleccionarse para la transferencia.

Los resultados presentados aquí vienen de una programa de PGS en el 90% de los embriones se obtuvo un diagnóstico para todos los cromosomas analizados; en el 10% restante no se pudieron interpretar las señales de hibridación para uno o más cromosomas, ya sea por las características intrínsecas de las sondas utilizadas, por la morfología del núcleo o la calidad de la extensión. Estos resultados similares a publicaciones por otros grupos como Manor <sup>^ÁÉ</sup>que obtuvieron resultados similares

con una eficiencia de hibridación del 87% para los autosomas y del 97% para los cromosomas sexuales (Manor <sup>^</sup>~~^~~<sup>^</sup>1996; Manor <sup>^</sup>~~^~~<sup>^</sup>1998). Los resultados de un ciclo de PGS también están influenciados por el número de embriones que se puedan analizar en cada caso. Para ello, es necesario que como resultado de la estimulación ovárica se obtenga un número mínimo de ovocitos. Vandervorst <sup>^</sup>~~^~~<sup>^</sup> aconsejan cancelar los ciclos en que se espere obtener menos de 6 ovocitos, ya que las expectativas de transferencia y embarazo se reducen considerablemente (Vandervorst <sup>^</sup>~~^~~<sup>^</sup>1998). Esto se debe a que durante todo el proceso, en cada paso se va reduciendo el número de embriones para una futura transferencia: desde la tasa de fecundación, que en nuestras pacientes de DGP de este trabajo es de 80%, la tasa de división, con el 77% de los cigotos fecundados con un buen desarrollo embrionario que permite la biopsia, hasta la fase final del análisis cromosómico, donde el porcentaje de embriones anormales puede exceder el 50%.

Por último, hay que tener en cuenta la presencia de mosaicismo en embriones humanos desde el estadio de 2 células. La incidencia de mosaicismo y su repercusión en un posible error de diagnóstico ha sido muy discutida. Munné <sup>144</sup>Encontraron que el 39,6% de los embriones bloqueados y el 25,2% de los fragmentados y/o con desarrollo lento presentaban mosaicismo, pero este porcentaje descendía al 14,1% en los embriones con buena evolución (Munné <sup>144</sup>1994).

### 1.4.2. Hibridación genómica comparada

En los últimos años se han desarrollado técnicas que permiten el análisis de todos los 24 cromosomas; como la hibridación genómica comparada (CGH) o el array de CGH, y la técnica ha pasado a denominarse CCS (del inglés, *Comparative Cytogenetic Screening*).

Los arrays de CGH han sustituido al FISH, ya que la posibilidad de analizar las aneuploidías para la totalidad de cromosomas ha mejorado notablemente los resultados reproductivos de las parejas que se realizan estos tratamientos. Estas técnicas de diagnóstico se pueden aplicar en diferentes estadios del desarrollo embrionario, para el análisis de los corpúsculos polares en los ovocitos, de blastómeros en embriones en día 3 de desarrollo, o de células procedentes del trofoectodermo en embriones en estadio de blastocisto. Aunque la mayor parte de los programas de DGP están centrados en la biopsia en día 3, y de modo creciente en la biopsia de trofoectodermo.

La técnica de array de CGH aplicada a DGP para cribado de aneuploidías permite el análisis simultáneo de los 23 pares de cromosomas humanos en una única célula, siendo capaz de detectar desequilibrios cromosómicos menores de 5 Mb a lo largo de todo el genoma humano. El análisis se puede realizar en un tiempo inferior a 24 horas, lo que permite la transferencia de los embriones en el mismo ciclo en el que se realiza la biopsia. Para aplicar la técnica de array de CGH en PGS es necesaria la amplificación genómica completa (WGA) a partir de una célula (corpúsculo polar o blastómero) o muy pocas células (biopsia de trofoectodermo), con el fin de obtener suficiente cantidad de ADN para realizar el análisis. El método de WGA ideal debe ofrecer buena cobertura genómica y proporcionar una fiel representación del original en cantidad suficiente.

Los trabajos publicados sobre la aplicación clínica de array de CGH ofrecen resultados esperanzadores para el análisis simultáneo de todos los cromosomas a partir de una única célula con la alta fiabilidad necesaria para su aplicación clínica, presentando varias plataformas con una capacidad de diagnóstico de aneuploidías en torno al 95%, tanto en biopsias de corpúsculo polar (Fishel <sup>et al</sup> 2010), como de blastómero (Hellani <sup>et al</sup> 2008; Rodrigo <sup>et al</sup> 2014; Johnson <sup>et al</sup> 2010; Mir <sup>et al</sup> 2013) o de trofoectodermo (Forman <sup>et al</sup> 2012; Yang <sup>et al</sup> 2012).

**Hf1qca 11** es la ganancia de un solo cromosoma ( $2n+1$  cromosomas).



**ΗΥΗΥgca 1U** es la ganancia de dos cromosomas homólogos, representada como  $(2n+2)$  cromosomas). Una persona tetrasómica posee 48 cromosomas.

**DYbHΥgca 1U**  $2n+3$  cromosomas.

Según el tipo de cromosomas afectados (sexuales o autosómicos):

**5bYi d`cJX1UXY`cg`Wca cgca Ug`gYI i UYg.** la aneuploidía de los cromosomas sexuales humanos se tolera mejor que la de los cromosomas autosómicos.

**5bYi d`cJX1U U hcgCj JWU** entre los seres humanos los sujetos aneuploides autosómicos nacidos vivos son menos frecuentes que los aneuploides de los cromosomas sexuales, tal vez porque no existe un mecanismo de compensación de la dosis en los cromosomas autosómicos. La mayoría de los aneuploides autosómicos aborta de forma espontánea, con excepción de los aneuploides de algunos autosomas pequeños, como el cromosoma 21. Dado el tamaño de estos cromosomas y que portan menos genes la presencia de copias adicionales es menos perjudicial.

Las aneuploidías más frecuentes corresponden a los cromosomas 21 (síndrome de Down o Mongolismo), 18 (síndrome de Edward), 13 (síndrome de Patau) y en los cromosomas sexuales X y Y (Síndromes de Turner y de Klinefelter). El origen de las anomalías cromosómicas, en concreto de las trisomías autosómicas, es principalmente materno (Fragouli <sup>1992</sup> 2013). En el caso de la trisomía 16, se ha observado un origen materno en el 100% de los casos. Las trisomías autosómicas de origen materno están frecuentemente asociadas con errores en la meiosis I, excepto la trisomía 18, donde predominan los errores en la meiosis II (Nicolaidis <sup>1998</sup> 1998). Para las trisomías de los cromosomas sexuales (XXX, XXY y XYY) la situación es diferente: el origen reside

en un elevado porcentaje en no disyunción durante la meiosis paterna o en las divisiones postzigóticas (Jacobs <sup>^</sup><sub>1995</sub>).

En las monosomías X, el origen del cromosoma X es normalmente materno (en el 80% de los casos), lo que implica errores en la meiosis paterna, que da lugar a espermatozoides nulisómicos para los cromosomas sexuales (Chandley, 1981). También se ha propuesto que la presencia de mosaicismo materno para los cromosomas sexuales podría dar lugar a embriones portadores de la monosomía 45, X (Reinisch, 1981).

La triploidía es el tercer tipo de anomalía más frecuente en los abortos espontáneos. La mayor parte de las triploidías son de origen paterno (Zaragoza <sup>^</sup><sub>2000</sub>; Egozcue <sup>^</sup><sub>2002</sub>) debido a la fecundación de un ovocito por más de un espermatozoide (McFadden <sup>^</sup><sub>2002</sub>) o también por la fecundación de un ovocito por un espermatozoide diploide, más frecuentes en varones oligozoospermicos (Egozcue <sup>^</sup><sub>2002</sub>). La diploidía no es tan frecuente en ovocitos, ya que las alteraciones del huso meiótico provocan fundamentalmente aneuploidías (Eichenlaub-Ritter <sup>^</sup><sub>1999</sub>) aunque se ha descrito un aumento en la proporción de ovocitos diploides a medida que aumenta la edad materna (Roberts <sup>^</sup><sub>1995</sub>).

En la mayor parte de los casos, los progenitores presentan cariotipos normales, lo que sugiere que se trata de anomalías cromosómicas <sup>^</sup><sub>[ ]</sub> (De Braekeleer <sup>^</sup><sub>1990</sub>). Se supone que la anomalía ha surgido como un evento esporádico o <sup>^</sup><sub>[ ]</sub> en la gametogénesis, y la meiosis I materna es el estadio más vulnerable. De los estudios sobre abortos trisómicos (Hassold <sup>^</sup><sub>1993</sub>) se concluye que estas no disyunciones se deben más al azar que a una predisposición biológica individual. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que los varones con problemas de fertilidad presentan un incremento de anomalías cromosómicas numéricas en sus espermatozoides (Pfeffer <sup>^</sup><sub>1999</sub>; Arán <sup>^</sup><sub>1999</sub>; Pang <sup>^</sup><sub>1999</sub>).

Por otro lado, en estudios realizados en ovocitos de pacientes de FIV se ha observado que un 26% presenta aneuploidías (Plachot <sup>1988</sup>), y esta cifra se eleva hasta un 50% en los pacientes de edad avanzada (Gianaroli <sup>1999</sup>). Los autores, a través de la técnica de FISH, han obtenido resultados similares, con un 29% de ovocitos aneuploides procedentes de mujeres menores de 35 años y un 56% de ovocitos aneuploides en mujeres mayores de 35 años (Sandalinas <sup>2002</sup>). También se ha descrito el fenómeno de división prematura del centrómero en algunas familias con historia de abortos espontáneos e infertilidad. En estos casos, se ha sugerido que las anomalías en los centrómeros podrían dar lugar a un mayor riesgo de inestabilidad cromosómica (Bajnóczy <sup>1993</sup>).

## 1.6. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Se han utilizado distintas estrategias de tratamiento a nivel de laboratorio FIV para pacientes de FI. Esto incluye transferencia en día 3, cultivo prolongado y transferencia en estadio de blastocisto utilizando el método co-cultivo, hatching asistido, diagnóstico genético preimplantacional (DGP) o donación de ovocitos (de los Santos <sup>et al</sup> 2003; Barrenetxea <sup>et al</sup> 2005; Guerif <sup>et al</sup> 2004; Simón <sup>et al</sup> 1999; Mercader <sup>et al</sup> 2003; Levitas <sup>et al</sup> 2004; Rubio <sup>et al</sup> 2000).

Dentro del conjunto de parámetros que pueden analizarse con objeto de realizar la mejor selección y transferencia embrionaria, podemos encontrar el estudio de aneuploidías. En esencia, se trata de poder seleccionar aquellos embriones cromosómicamente normales, con las mayores garantías reproductivas usando las técnicas del Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP). Las alteraciones genéticas suponen una importante causa de esterilidad e infertilidad y pueden ser responsables de un porcentaje importante de los defectos congénitos que se observan en abortos espontáneos y recién nacidos. Las alteraciones cromosómicas numéricas <sup>et al</sup> estarían implicadas en un 6% de los recién nacidos y además estas últimas estarían presentes en más del 50% de los abortos espontáneos del primer trimestre.

En los últimos años, el DGP se ha aplicado también como una herramienta adicional para la selección de embriones en varios grupos de pacientes, consideradas como de “mal pronóstico” en centros de reproducción asistida. La técnica más utilizada hasta ahora para el cribado cromosómico embrionario había sido la hibridación <sup>et al</sup> fluorescente (FISH) para un número limitado de cromosomas; siendo más frecuente el análisis de 9 cromosomas: (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X e Y) que permitía la detección de aproximadamente el 80-85% de aneuploidías presentes en abortos espontáneos. La hipótesis en el estudio genético de los embriones es aumentar el

éxito reproductivo en los ciclos de FIV mediante análisis de 9 cromosomas que en teoría reduciría las concepciones cromosómicamente anormales por lo tanto reduciendo abortos y fallos de implantación. Inicialmente el análisis de un blastómero de un embrión en día 3 de desarrollo, mediante el método de FISH, permite la selección de embriones cromosómicamente normales para la transferencia sin afectar negativamente al potencial de desarrollo o de implantación del embrión (Hardy <sup>^</sup><sub>^</sub><sup>^</sup>1990). El DGP se está convirtiendo en un procedimiento habitual en pacientes con mal pronóstico reproductivo y con predisposición a tener un mayor número de embriones anormales y cada vez están aumentando más sus indicaciones, siendo el fallo de implantación una de ellas (Gianaroli <sup>^</sup><sub>^</sub><sup>^</sup>1997; Gianaroli <sup>^</sup><sub>^</sub><sup>^</sup>1999; Magli <sup>^</sup><sub>^</sub><sup>^</sup>1998; Pehlivan <sup>^</sup><sub>^</sub><sup>^</sup>2003).

Existen varios estudios retrospectivos que apoyan esta hipótesis, donde se ha observado un aumento en anomalías cromosómicas en los embriones de pacientes de peor pronóstico en reproducción asistida incluyendo el grupo de fallo de implantación y un aumento en éxito reproductivo después de PGS (Kahraman <sup>^</sup><sub>^</sub><sup>^</sup>2000; Gianaroli <sup>^</sup><sub>^</sub><sup>^</sup>2002; Munné <sup>^</sup><sub>^</sub><sup>^</sup>2005; Rubio <sup>^</sup><sub>^</sub><sup>^</sup>2003; Rubio <sup>^</sup><sub>^</sub><sup>^</sup>2005; Pehlivan <sup>^</sup><sub>^</sub><sup>^</sup>2003).

Se ha publicado sin embargo un meta-análisis incluyendo 9 estudios randomizados que concluye que el uso de PGS no demuestra una mejora en los resultados en pacientes de peor pronóstico en reproducción asistida incluyendo los de FI (Mastenbroek <sup>^</sup><sub>^</sub><sup>^</sup>2007; Mastenbroek <sup>^</sup><sub>^</sub><sup>^</sup>2011; Staessen <sup>^</sup><sub>^</sub><sup>^</sup>2004). Un estudio randomizado en pacientes de FI ha demostrado que el uso de PGS no consigue una mejora en los resultados (Blockeel <sup>^</sup><sub>^</sub><sup>^</sup>2008).

Estos estudios fueron muy criticados por la metodología, selección de pacientes, técnica de biopsia, método de cultivo utilizado y tipo de análisis genética realizado

(Rubio <sup>^</sup><sub>2005</sub>; Milán <sup>^</sup><sub>2010</sub>; Cohen <sup>^</sup><sub>2007</sub>; Simpson, 2008; Rubio <sup>^</sup><sub>2009</sub>; Mir <sup>^</sup><sub>2010</sub>).

Se ha sugerido el uso de nuevas técnicas como el análisis de 24 cromosomas y biopsia de trofoectodermo para mejorar los resultados con DGP (Wells <sup>^</sup><sub>2008</sub>; Harton <sup>^</sup><sub>2011</sub>). En los últimos años se han desarrollado técnicas que permiten el análisis de todos los cromosomas y la técnica ha pasado a denominarse  $\hat{O}[\{ \} / ^{\wedge} @ \} \cdot \tilde{q} ^{\wedge} \hat{D} @ \{ [ \cdot [ \{ ^{\wedge} \& ' ^{\wedge} \} \tilde{q} ^{*} \hat{A} (CCS)$ , o cribado cromosómico completo. En un espacio muy reducido de tiempo, el CCS ha sustituido al PGS mediante FISH, ya que la posibilidad de analizar las aneuploidías para la totalidad de los cromosomas ha mejorado notablemente los resultados reproductivos de las parejas que se realizan estos tratamientos. Estas técnicas de cribado se pueden aplicar, con mayor facilidad y fiabilidad que la técnica de FISH, en diferentes estadios del desarrollo embrionario: corpúsculos polares en los ovocitos; blastómeros en embriones en día 3 de desarrollo; o de células procedentes del trofoectodermo en embriones en estadio de blastocisto. De cualquier forma, la mayor parte de los programas de DGP están centrados en la biopsia en día 3, y de modo creciente en la biopsia de trofoectodermo.

Las parejas con fallo de implantación presentan una elevada incidencia de anomalías cromosómicas que se ha determinado en varios estudios. Por ello se ha propuesto que la selección de embriones cromosómicamente normales podría mejorar la capacidad de implantación de estos embriones.







**&"C6>9H=JCG**



1. Comparar en un estudio prospectivo randomizado los resultados clínicos obtenidos en pacientes de fallo de implantación con DGP mediante la técnica de FISH para 9 cromosomas frente a los resultados de pacientes de las mismas características que no realizaron biopsia embrionaria y se transfirieron embriones en estadio de blastocisto sin analizar.
2. Analizar los resultados clínicos retrospectivos en pacientes de fallo de implantación, cuando se incorpora el análisis de 24 cromosomas mediante array de CGH. Evaluar los diferentes tipos de anomalías cromosómicas.
3. Analizar el impacto clínico de diferentes factores: edad materna, número de fallos previos, factor masculino y número de ovocitos MII obtenidos.



' "A5H9F5 @GMAvHC8CG



### 3.1. DISEÑO Y SELECCIÓN DE PACIENTES

Se trata de un estudio con 2 etapas.

1. Primera etapa es analizar los resultados de un estudio prospectivo randomizado que se realizó entre 2004-2011, en 91 pacientes de FI con  $\geq 3$  ciclos fallidos mediante FISH comparando resultados con biopsia embrionaria en día 3 versus transfer de blastocisto sin análisis cromosómico.
2. La segunda etapa consiste en un estudio retrospectivo en 491 pacientes de FI con  $\geq 2$  ciclos fallidos donde se ha realizado el análisis cromosómico de 24 cromosomas en embriones mediante array de CGH.

#### **Estudio 1:**

*D; G'i H'j]nUbXc`UlfVb]WU: -G<`Yb`dUMYbhYg`XY`ZU`c`XY`ja d`UbhUMYQb. i b`Ygli Xjc`dfcgdYWfj c`mifUbXca jnUXc"*

En este estudio FI fue definido como  $\geq 3$  ciclos fallidos tras la transferencia de embriones de buena morfología. Los pacientes fueron asignados en dos grupos a través de una randomización generada por un ordenador: Grupo A: ciclo de ICSI convencional con transferencia de blastocistos en día 5; y Grupo B: ciclo de DGP con la investigación de nueve cromosomas (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X, Y) y transferencia de blastocisto en el día 5. Los embriones detenidos en la etapa de división antes de la compactación fueron considerados como no adecuados para transferir. La transferencia de embriones fue cancelado en los ciclos con todos los embriones detenidos o cuando anomalías cromosómicas eran detectados en todos los embriones biopsiados. Este RCT fue aprobado por el Comité de Revisión Institucional de Instituto Valenciano de Infertilidad en 2004. Un consentimiento por escrito se obtuvo de los pacientes antes de entrar en el estudio. Debido al entorno en el que se realizó el estudio, una clínica privada de infertilidad, los médicos y los pacientes estaban al tanto del tratamiento

adjudicado. Todos los pacientes reclutados en el estudio se sometieron a estudio diagnóstico de la infertilidad y a las investigaciones dirigidas a FI.

Ü^Á^ä[ } Á[ •Á~ } c•Á•c äq •Á^Áq -^!qäqäÁ äqä^•äqäÁq •äqä^•äqäÁq •äqä^•äqäÁq } qäqä^•ÁÁ  
däqä^•Á^Áq[ Á^Áq ] |äqäqä) Äq c•Á^Á[ { ^c!•^Á} Á} Äq[ Á^ÄQIA

### 1. Pruebas de la reserva ovárica.

- Recuento de folículos antrales
- FSH
- E<sub>2</sub>

### 2. Investigaciones de siguientes patologías orgánicas genitales.

- Q[!Á^& \*!äqä^Á&~ ä[ Á^Á^~^!^ÁÁ][!Á Q[!•][ \*!äqä^Äq[!•] ä[ \*!äqä^Äq[!•] •äqä^} ä[ { ^däqä^Äq[!•] •äqä^} ä[ •&] äqäqä[ •&] äqäqä
- Hidrosálpinx
  - Malformaciones Müllerianas
  - Miomas
  - Pólipos endometriales
  - Adherencias intrauterinas
  - Infecciones
  - Un cérvix estrecho o pólipos cervicales (en casos de transferencia difícil)

### 3. Cariotipos de ambos parejas.

### 4. Pruebas de sangre de trombofilias maternas:

- Anticoagulante lúpico
- Anticuerpos anticardiolipina IgG e IgM
- Déficit de Antitrombina III
- Déficit de proteína C
- Déficit de proteína S
- Resistencia a Proteína C activada
- Homocisteína
- Mutación de factor V Leiden (en pacientes con resistencia a proteína C activada)
- Mutación C677T homocigota de la metileno tetrahidrofolato reductasa (MTHFR)
- Mutación G20210A gen protrombina

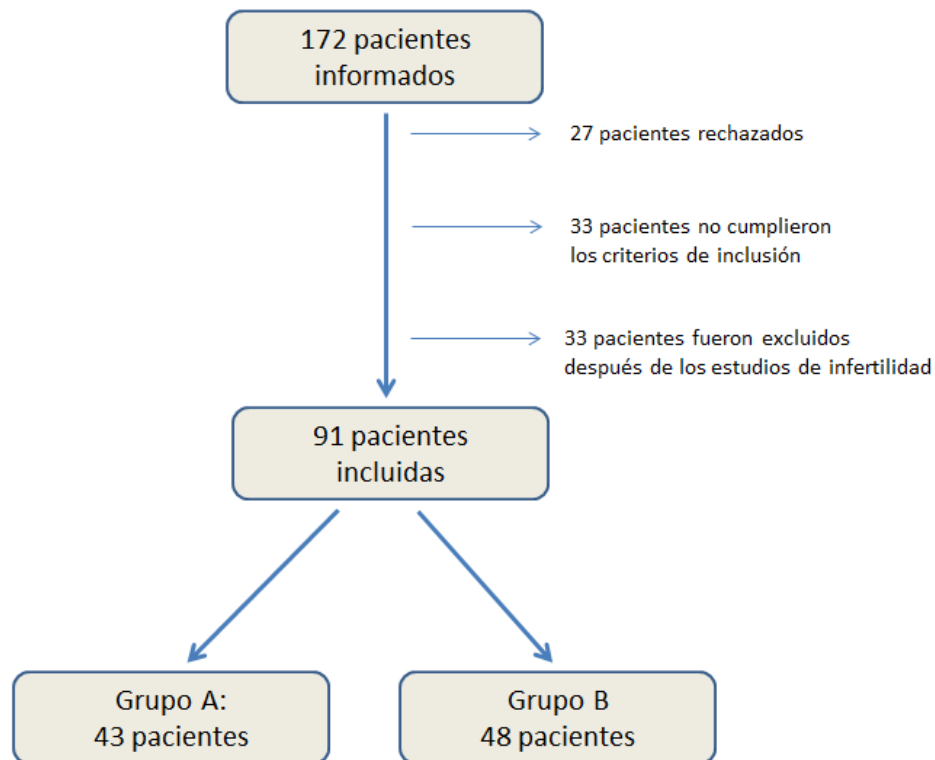


Los criterios de inclusión de las pacientes en el estudio de PGS-FISH fueron los siguientes: Edad de la mujer <40 años, ≥3 fallos de implantación en ciclos anteriores de FIV/ICSI (en cada intento con la transferencia de al menos 2 embriones de buena calidad en ciclos frescos), ≥5 ovocitos maduros (MII) obtenidos en ciclos anteriores, índice de masa corporal <30 kg/m<sup>2</sup>, ninguna anomalía en el estudio diagnóstico de la infertilidad y una reserva ovárica normal (en día 2-3 del ciclo: FSH<10 IU/mL, E<sub>2</sub><65 pg/mL, y número de folículos antrales ≥8).

Los criterios de exclusión fueron definidos como los siguientes: cualquier anomalía detectada en el estudio previo de infertilidad; hidrosálpinx; embarazos o abortos involuntarios anteriores, ectópicos; presencia de miomas, adherencias o pólipos; historia de una transferencia embrionaria con alta dificultad y/o sangrado; pacientes con otras indicaciones para DPI, y los pacientes con menos de cinco ovocitos MII en un ciclo anterior.

El estudio se inició en 2004 y se cerró en diciembre de 2011. Se han definido la cancelación de la transferencia y las tasas de implantación evolutivas como objetivos principales del estudio y según el cálculo del tamaño muestra inicial, se deberían haber incluido un total de 250 pacientes. Durante el desarrollo del estudio, el objetivo final del estudio se cambió por la tasa de nacido vivo. Un total de 172 parejas fueron informadas inicialmente sobre el estudio; 27 pacientes rechazaron participar en el estudio, 33 pacientes no cumplieron los criterios de inclusión, y 21 pacientes fueron excluidas después del estudio de la infertilidad. Ninguna de las parejas fue excluida debido al insuficiente número de ovocitos MII. Finalmente, 91 pacientes fueron registrados en el estudio: 43 en grupo A y 48 en grupo B (Figura 1).

**Figura 1:** Resumen de reclutamiento de pacientes en el estudio prospectivo de FI.



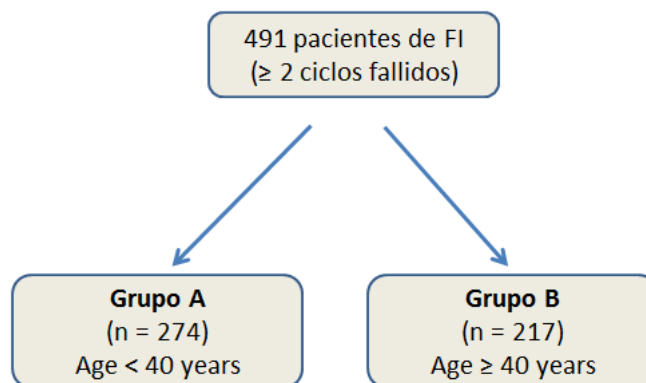
## **Estudio 2:**

7 f]VUXc`XY'UbYi d`c]XqUg`Vt b`UffUmXY7; <`Yb`VUgcg`XYZU`c`XY'ja d`UbHUMQb. 'un estudio retrospectivo '

Este es un estudio retrospectivo de PGS en pacientes de FI en que se realizó una biopsia en día 3 y un análisis de array de CGH, desde 2010 a 2014. Se realizaron un total de 491 ciclos DPI con array-CGH, para parejas con al menos dos fallos anteriores de FIV/ICSI tras la transferencia de embriones de buena morfología. La edad de las mujeres era entre 29 a 44 años. Para analizar las diferencias en la incidencia de anomalías cromosómicas correlacionados con la edad, este grupo de pacientes se

subdividió en dos grupos: mujeres menores de 40 años ( $n = 274$ ) o mayores o iguales a 40 años ( $n = 217$ ), respectivamente (Figura 2).

**Figura 2:** Pacientes del estudio retrospectivo de FI.



## 3.2. TRATAMIENTO

### 3.2.1. Fecundación *in vitro* (FIV)

Todas las mujeres que participaron en ambos estudios realizaron FIV que es un tratamiento en el grupo de técnicas de reproducción asistida. La esencia de la técnica es la fecundación del ovocito en condiciones de cultivo *in vitro*, previa obtención y preparación de los gametos para la posterior transferencia de los embriones a la cavidad uterina. Para obtener un mayor rendimiento de la FIV es deseable disponer de un número adecuado de ovocitos para inseminar, ya que así se consiguen embriones para la transferencia en fresco y, dado el caso, se pueden congelar los no transferidos. Para inducir la maduración de varios folículos, se emplea el desarrollo folicular múltiple, mediante estimulación ovárica.

### 3.2.2. La estimulación ovárica

En tratamientos de reproducción asistida se usa las gonadotropinas (FSH, LH, hMG)

para la estimulación ovárica que se administran por vía intramuscular o subcutánea dependiendo del producto. También, se utilizan los análogos de la GnRH de forma rutinaria en los tratamientos de reproducción asistida, con el fin de evitar el pico endógeno de LH y luteinización prematura.

Se utiliza principalmente dos protocolos de superovulación según el análogo de GnRH usado (protocolo largo o antagonista) para conseguir el crecimiento y maduración de un número mayor de folículos ováricos. Se comienza la estimulación ovárica el segundo o tercer día del ciclo con una dosis individualizado y adecuada de gonadotropina (según la edad y reserva ovárica) que se mantiene durante 4-5 días. Tras el primer control de la paciente, podría modificarse la dosis de las gonadotropinas para los días posteriores en función de la respuesta de la mujer. Cuando existe 2 folículos que miden  $\geq 18$  mm se administra hCG recombinante para la inducción de la maduración final ovocitaria. Recientemente, también se utiliza análogo de la GnRH como inductores de la maduración final ovocitaria cuando se use un antagonista de la GnRH como análogo de la misma especialmente en casos en riesgo de desarrollar el síndrome de hiperestimulación ovárica.

### **3.2.3. Aspiración folicular - recuperación de los ovocitos**

Habitualmente se realiza la aspiración de los folículos guiada por ultrasonografía bajo anestesia general o sedación intravenosa a las 36 horas de la administración de la hCG. Se introduce la sonda ecográfica en la vagina, protegida con una funda estéril y la guía ya acoplada. Una vez localizado el ovario, se pincha sucesivamente los folículos del ovario con una aguja para recuperar un número mayor de ovocitos. Tras la punción de todos los folículos de un ovario, se extrae la aguja y se procede a puncionar el otro ovario de la misma manera. Los tubos de aspiración con líquido folicular, pasan al laboratorio que se encuentra contiguo al quirófano, donde el equipo de biólogos procede a la recuperación de los ovocitos.

### 3.2.4. Preparación de los ovocitos y espermatozoides

Los complejos corona-cúmulo-ovocito se identifican después de la aspiración, y se incuban a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>. Antes de la realización de ICSI es necesario decumular (la eliminación de las células del cumulus) los ovocitos para poder visualizar el estado de madurez nuclear de los mismos, lo que nos permite seleccionar los ovocitos maduros para el procedimiento. Además de conocer la madurez nuclear, esta decumulación nos permite evaluar la morfología ovocitaria. La eliminación de las células del cumulus se realiza entre 2 y 4 horas después de la punción folicular. Este procedimiento se efectuará utilizando una solución de hialuronidasa y pipetas Pasteur (Joris <sup>^</sup>1998). Ovocitos en metafase II son ovocitos maduros, aptos para ser microinyectados, en los que se observa claramente la presencia del primer corpúsculo polar. Ovocitos en estado de vesícula germinal y metafase I son inmaduros y no se microinyectarán. Tampoco, se microinyectarán ovocitos atrésicos o degenerados que se caracterizan por presentar un citoplasma oscuro.

La recogida de la muestra de espermatozoides se realiza por masturbación, recomendándose abstinencia sexual de unos 2-5 días. Para capacitar la muestra de semen se utiliza tanto la técnica de separación por gradientes de densidad o la técnica de <sup>•</sup>, <sup>q</sup> <sup>Á</sup> <sup>J</sup> <sup>È</sup>

### 3.2.5. La inyección intracitoplásmica de espermatozoides

Una vez que tenemos decumulados los ovocitos y preparados los espermatozoides, se colocan los ovocitos en la placa de microinyección y se procede inmediatamente a la inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI). La ICSI consiste en la microinyección de un espermatozoide en el interior de un ovocito que previamente se ha decumulado. A través de la pipeta Holding el ovocito queda inmóvil y se usa la pipeta de inyección para microinyectar, el ovocito inmovilizado, con un espermatozoide (Palermo <sup>^</sup>1992; Palermo <sup>^</sup>1995; Mínguez <sup>^</sup>1996). La inmovilización del

espermatozoide, previa ruptura de su flagelo, es necesaria tanto para facilitar la manipulación del espermatozoide y que no destruya las estructuras del ovocito una vez que esté dentro de éste, como para facilitar la descondensación del núcleo. A las 17-20 horas de la microinyección se evalúa la fecundación al día siguiente (día1).

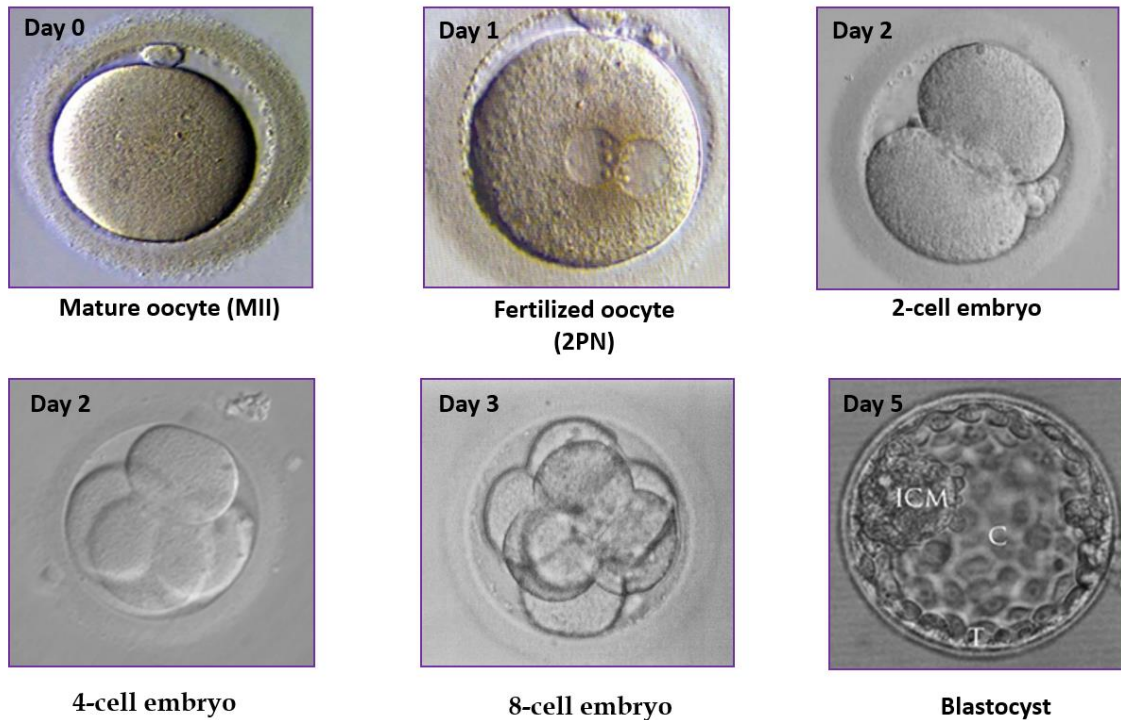
### 3.2.6. Desarrollo embrionario

Se evalúa la fecundación de los ovocitos a las 17-20 horas después de la microinyección (en día 1). A continuación el cigoto se divide en dos células. Cuando el embrión posee entre 4 y 8 blastómeros se producen la activación del genoma embrionario. Después de la compactación de las células se produce la diferenciación celular. Este embrión recibe el nombre de blastocisto.

Se evalúa la fecundación de los ovocitos a las 17-20 horas después de la microinyección (en día 1). A continuación el cigoto se divide en dos células. Cuando el embrión posee entre 4 y 8 blastómeros se producen la activación del genoma embrionario. Después de la compactación de las células se produce la diferenciación celular. Este embrión recibe el nombre de blastocisto.

<b>Día 0:</b> día de la aspiración folicular.
<b>Día 1:</b> se observa la fecundación.
<b>Día 2:</b> se produce la primera división embrionaria. Mayoritariamente podemos observar embriones que tienen entre 2 y 4 células.
<b>Día 3:</b> el embrión posee entre 6 y 8 blastómeros.
<b>Día 4:</b> posteriores divisiones dan lugar a un embrión de 16-32 células denominado mórula. A continuación, los blastómeros se van compactando formando lo que denominamos mórula compacta.
<b>Día 5 y 6:</b> empieza a formarse una cavidad denominada blastocelo y se produce la diferenciación celular. Podemos observar blastocistos temprano, cavitado, expandido, eclosionando ("hatching") ó eclosionado ("hatched"). Se observa el blastocelo rodeado por una monocapa celular ó trofoectodermo que formará la placenta y una masa celular interna que dará lugar al embrión.

**Figura 3:** Fotografías de embriones humanos que muestran diferentes etapas de desarrollo desde el día de la recuperación de ovocitos (día 0) hasta etapa de blastocisto (día 5). ICM: masa celular interna del blastocisto, T: trofoectodermo, C: Cavidad del blastocisto.



### 3.2.7. Cultivo prolongado

Inicialmente en los tratamientos de FIV/ICSI la transferencia embrionaria rutinariamente se realizaba en el día 2 (embrión de 2-4 células) o día 3 (embrión de 6-8 células) de desarrollo. Posteriormente se extendió la transferencia embrionaria en día 5 o 6 cuando los embriones están en estadio de blastocisto. Hoy día, la transferencia en estadio de blastocisto se realiza como un procedimiento rutinario en muchos centros de reproducción asistida, además en casi todos los grupos de pacientes. En las pacientes de los programas de DGP, generalmente se realiza la transferencia de embriones "normales" en el día 5-6 de desarrollo.

Uaas&~|aãaÁ|•Á{ à!ã } ^•Á@e caÁ|Á•caãq Á^Á|aã d &a d Á^} ^{ [•Á} Áaã&cãããÁ  
 ^} Á|Áaã[!aã!ã Á|•Á[•ããããã^•K&|ã|ã|Á&~|ã|Á^&~^} &aãE

### 3.2.7.1. Co-cultivo endometrial

El co-cultivo consiste en cultivar cigotos o embriones de 2-4 blastómeros, sobre una monocapa de células, hasta el estadio de blastocisto. El origen de las células que forman la monocapa es muy diverso (Mercader <sup>^óãE</sup>2002). Las células de la monocapa pueden proporcionar elementos traza y/o factores de crecimiento que no están presentes en los medios definidos, además de eliminar de los medios factores tóxicos para el embrión como el amoníaco. Los embriones co-cultivados poseen menor fragmentación y mayor número de blastómeros que aquellos que son cultivados sólo con medio (Wiemer <sup>^óãE</sup>1989; Vlad <sup>^óãE</sup>1996).

En el programa de Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) utilizamos las células del epitelio endometrial humano para el co-cultivo (Mercader <sup>^óãE</sup>1998). La monocapa se obtiene a partir las células epitelio-glandulares de una biopsia de endometrio, en fase secretora. Esta técnica se apoya en trabajos básicos de investigación realizados en IVI que ponen de manifiesto que la monocapa endometrial proporciona un ambiente más fisiológico para el desarrollo embrionario (De los Santos <sup>^óãE</sup>1996; Simón <sup>^óãE</sup>1997).

**DfYdUFUMj05'XY~Ua cbcWUdUXYWf'i`Ug`YdJhYJU'Yg'XY'YbXca Yff]c.**

Después de recoger la biopsia de endometrio se coloca en el tubo con el medio de transporte, la biopsia se pasa a una placa Petri con el medio de transporte. La manipulación de la biopsia se realiza en una campana de flujo laminar.
- Se coloca este tejido "limpio" en un tubo cónico de 9ml de DMEM y 1ml de collagenasa (0.1% de collagenasa).
- Se coloca este tubo en posición horizontal, durante 1 hora, en un baño a 37°C y con movimiento (75U/min).
- Se saca el tubo cónico y se coloca en una gradilla, en la campana de flujo laminar, durante 10 minutos.





La transferencia embrionaria intrauterina es el proceso mediante el cual depositamos en la paciente los embriones generados en el laboratorio de fecundación ~~in vitro~~ (FIV). En el laboratorio de FIV, el embriólogo carga los embriones seleccionados (por criterios de morfología y resultados de DPI) en un catéter de transfer. Bajo control ecográfico y con una vejiga llena, se canaliza el cérvix cuidadosamente con el catéter que contiene el embrión (o los embriones) hasta llegar al tercio superior de la cavidad endometrial, donde se inyectan los embriones y luego se retira el catéter lentamente. Después de la

### 3.3. PROCEDIMIENTOS DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL

$$\hat{O}[\{[[]^* \text{G} \text{A}$$

-Á 81U\$ aspiración folicular e ICSI
-Á 81U% valoración de la fecundación a las 18-20 horas
-Á 81U& valoración del desarrollo embrionario a las 24 horas. Se colocan los embriones en co-cultivo
-Á 81U' Kbiopsia embrionaria de los embriones evolutivos, fijación de blastómeros y comienzo del análisis genético mediante FISH
-Á 81U( Kvaloración del desarrollo embrionario
-Á 81U ) Kselección para la transferencia de los embriones euploides con buena evolución.

La biopsia embrionaria se realiza en el tercer día de desarrollo [44], cuando los embriones tienen entre 6 y 8 células. Solo se biopsia embriones con  $\geq 5$  células con núcleos y con  $\leq 25\%$  de fragmentación. La biopsia se puede resumir de la siguiente manera: los embriones se colocan en una gota de medio de biopsia que es ausente de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  (G-PGD, Vitrolife, Göteborg, Suecia / LifeGlobal Guilford, CT), la zona pelúcida se perfora utilizando la tecnología láser (OCTAX, Herbron, Alemania). Se extraen 1 o 2 blastómeros, en los que se haya podido distinguir un núcleo interfásico único en su interior (Figura 4). La extracción de un número de células correspondiente a la cuarta parte de la masa embrionaria en este estadio no tiene implicaciones significativas en el desarrollo embrionario hasta blastocisto, ni en sus patrones metabólicos. El embrión se mantiene en el laboratorio hasta conocer el resultado del



### 3.3.2. Fijación de blastómeros e hibridación fluorescente (FISH)

La técnica de FISH utiliza sondas de ADN marcadas con moléculas fluorescentes que se unen a secuencias cromosómicas específicas. De este modo, es posible enumerar las copias de un determinado cromosoma presentes en el núcleo de una célula. Las sondas utilizadas en nuestros trabajos han sido de 3 tipos: Secuencias centroméricas (sondas CEP) y secuencias de ADN satélite (150-300 pb) altamente repetitivas: cromosomas 15, 16, 17, 18, X e Y. Secuencias específicas de LSI (sondas LSI) de copia única (200-400 kb) o con un número reducido de copias, específicas de genes o agénicos: cromosomas 13, 21 y 22. Sondas específicas subteloméricas, de hasta 300 kb de tamaño, para las rondas adicionales de rescate de señales no informativas o dudosas: cromosomas 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22. La técnica de FISH requiere que el núcleo del blastómero biopsiado se extienda en un portaobjetos previamente desengrasado, con la precaución de eliminar por completo los restos de citoplasma que pueden quedar alrededor. Hay que conservar la integridad y la morfología del núcleo usando la solución de fijación (metanol: ácido acético glacial, 3:1), utilizando el método de Tarkowski (1966). Básicamente, la técnica de FISH consta de las siguientes fases:

- La desnaturalización de la doble cadena de ADN de la muestra biológica y de las sondas de ADN. Las extensiones y las sondas fluorescentes se pueden desnaturalizar por separado o bien de forma conjunta (codesnaturalización). En el primer caso, para desnaturalizar las muestras, se colocan los portaobjetos en una cubeta con una solución de formamida al 70% a  $73 \pm 1$  °C durante 5 min, y las sondas se desnaturalizan también durante 5 min en un eppendorf sumergido en un baño termostatzado a  $73 \pm 1$  °C. En la codesnaturalización, la mezcla de sondas se coloca directamente sobre el área de hibridación del portaobjetos donde se encuentra la muestra, y se desnaturalizan la sonda y la muestra de forma conjunta a  $73 \pm 1$  °C.

- La hibridación bajo condiciones controladas de humedad y temperatura de la sonda de ADN con su secuencia complementaria en el núcleo que se pretende evaluar, formando así un heterodúplex. El tiempo de hibridación varía en función de la sonda utilizada.
- La detección de las señales con microscopio de fluorescencia tras realizar una serie de lavados para eliminar el exceso de sonda unido inespecíficamente al núcleo evaluado. Para ello, se sumergen los portaobjetos durante 2 min en una cubeta coplin con 0,4 x SSC a 73 °C en un baño térmico. A continuación se realiza un segundo lavado de 30 s en una cubeta con 2 x SSC/0,1% NP-40 a temperatura ambiente. Se utiliza también una contratinción que facilita la visualización de toda la cromatina y la identificación de las marcas fluorescentes en el núcleo.
- La interpretación de los resultados es inmediata, mediante un microscopio de fluorescencia equipado con los filtros adecuados. Se contabiliza el número de marcas fluorescentes que aparece en cada núcleo para todos los cromosomas analizados.

### 3.3.2.1 Protocolo de FISH

% fcbXUXY\ JVfjXUMjCB.
- Deshidratar las extensiones en una serie creciente de alcoholes de 70, 85 y 100% etanol, colocando los portaobjetos 1 minuto en cada cubeta. Dejar secar a temperatura ambiente.
- A continuación para el análisis simultáneo de los cromosomas 13, 16, 18, 21 y 22, se utiliza el kit comercial MultiVysion PB (Vysis, Inc.). Colocar 3 µl de la mezcla sobre el área de hibridación, utilizando cubreobjetos de 12 mm de diámetro y sellar.
- Co-desnaturalizar en placa calefactora (Hybrite, Vysis Inc.) durante 3 minutos a 73° C e hibridar a continuación entre 3 y 5 horas a 37°C.
- Aplicar 10 µl de Antifade II (Vysis Inc.) sobre el área de hibridación y cubrir con un cubreobjetos de 24x24 mm.

<p>- Colocar las extensiones durante 3 minutos, agitando ligeramente, en una cubeta con 2xSSC/0,1% NP-40 a temperatura ambiente.</p>
<p>- Deshidratar las extensiones en una serie creciente de alcoholes de 70, 85 y 100% etanol, colocando los portaobjetos 1 minuto en cada cubeta. Dejar secar a temperatura ambiente.</p>
<p>- A continuación para el análisis simultáneo de los cromosomas 15, 17, X y Y, se utiliza el kit comercial T<sup>®</sup>  aX<sup>•</sup>•q} ÁÁÖ   ÁÖ<sup>•</sup>q { ÁX<sup>•</sup>•ãÉQ&amp;ÉQq [ãÉÁÜÖE cromosoma 15 (Spectrum Orange), cromosoma 17 (Spectrum Aqua), cromosoma Y (Spectrum Blue), cromosoma X (Spectrum Green). Colocar 3 µl de la mezcla sobre el área de hibridación, utilizando cubreobjetos de 12 mm de diámetro y sellar.</p>
<p>- Co-desnaturalizar en placa calefactora (Hybrite, Vysis Inc.) durante 3 minutos a 73° C e hibridar a continuación durante 3 y 5 horas a 37°C.</p>
<p>- Tras los lavados post-hibridación, aplicar 10 µl de DAPI II sobre el área de hibridación, cubrir con un cubreobjetos de 24x24 mm y evaluar (Figura 8).</p>
<p><b>' Y' fcbXU XY \ JvfJXUMjCB' UXJWcbU' Wëb' gcbXUg' hYca YfJWUg' dUfU gY' UYg' bc' jbzfa Ufj cg'c'Xi XcgUg'</b></p>
<p>- Colocar las extensiones durante 3 minutos, agitando ligeramente, en una cubeta con 2xSSC/0,1% NP-40 a temperatura ambiente.</p>
<p>- Deshidratar las extensiones en una serie creciente de alcoholes de 70, 85 y 100% etanol, colocando los portaobjetos 1 minuto en cada cubeta. Dejar secar a temperatura ambiente.</p>
<p>- A continuación para el análisis del cromosoma a validar se eligen las s[ ]ããA<sup>•</sup>•~àc   { ...ãã X<sup>•</sup>•ãÉQ&amp;ÉQq [ãÉÁÜÖE 13q (Spectrum Orange), 15q (Spectrum Orange), 16p (Spectrum Green), 16q (Spectrum Orange), 17p (Spectrum Green), 17q (Spectrum Orange), 18q (Spectrum Orange), 21q (Spectrum Orange) y 22q (Spectrum Orange). Preparar una mezcla de la sonda y colocar 3 µl de la mezcla sobre el área de hibridación, utilizando cubreobjetos de 12 mm de diámetro y sellar.</p>
<p>- Co-desnaturalizar en placa calefactora (Hybrite, Vysis Inc.) durante 3 minutos a 73° C e hibridar a continuación durante 3 y 5 horas a 37°C.</p>
<p>- Tras los lavados post-hibridación, aplicar 10 µl de DAPI II sobre el área de hibridación, cubrir con un cubreobjetos de 24x24 mm y evaluar (Figura 8).</p>





### 3.3.3. ARRAY DE CGH

La técnica de array de CGH aplicada a DGP para el diagnóstico de aneuploidías permite el análisis simultáneo de los 23 pares de cromosomas humanos en una única célula, siendo capaz de detectar desequilibrios cromosómicos menores de 5 Mb a lo largo de todo el genoma humano. El análisis se puede realizar en un tiempo inferior a 24 horas, lo que permite la transferencia de los embriones en el mismo ciclo en el que se realiza la biopsia.

La biopsia se realiza en día 3 y se puede resumir de la siguiente manera: los embriones se colocan en una gota de medio de biopsia que es ausente de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  (G-PGD, Vitrolife, Göteborg, Suecia / LifeGlobal Guilford, CT), la zona pelúcida se perfora utilizando la tecnología láser (OCTAX, Herbron, Alemania), y se retira un blastómero de cada embrión. Blastómeros individuales se colocan en tubos de PCR de 0,2 ml que contienen 2  $\mu\text{l}$  de PBS, y 1% de polivinilpirrolidona (PVP) se utiliza para el lavado de blastómeros y manipulación.

Para aplicar la técnica de array de CGH en DGP es necesaria la amplificación genómica completa (whole genome amplification - WGA) a partir de una (corpúsculo polar o blastómero) o muy pocas células (biopsia de trofoectodermo), con el fin de obtener suficiente cantidad de ADN para realizar el análisis. El método de WGA ideal debe ofrecer buena cobertura genómica y proporcionar una fiel representación del original en cantidad suficiente. Este ADN amplificado se marca con fluorescencia y se hibrida sobre la plataforma del array simultáneamente con un ADN control de un individuo normal. La plataforma del array está formada por miles de puntos que contienen diferentes secuencias de ADN normal distribuidas a lo largo de todo el genoma. Aunque existen diferentes tipos de plataformas, las más utilizadas en clínica son los arrays de BACs (Bacterial Artificial Chromosomes) cuyos puntos están compuestos por fragmentos extraídos de clones de BACs.

Los protocolos utilizados en este tipo de tecnología se pueden esquematizar en las siguientes etapas:

- a) Amplificación del ADN.
- b) Marcaje con fluorocromos.
- c) Precipitación e hibridación sobre los array correspondientes.
- d) Lavado, escaneado e interpretación de los resultados con el software correspondiente.

La lectura de los resultados se realiza con un escáner equipado con láser de dos canales, un canal verde (532 nm) para la excitación y lectura de la señal Cy3 y un canal rojo (635 nm) para la excitación y lectura de la señal Cy5. Las imágenes TIFF generadas por el escáner se analizan con un programa informático de análisis de datos específico para array de CGH, que normaliza las intensidades de fluorescencia de los canales Cy3 y Cy5, y genera un gráfico que representa la cantidad de ADN de la muestra respecto del ADN control (eje Y) para cada uno de los 24 cromosomas (eje X). La “ganancia o pérdida” de material genético se representa por puntos que se desvían hacia la parte superior o inferior del gráfico, respectivamente. Además permite identificar alteraciones cromosómicas parciales, que afectan a un segmento terminal de algún cromosoma concreto (Figura 6).

### 3.3.3.1 Materiales

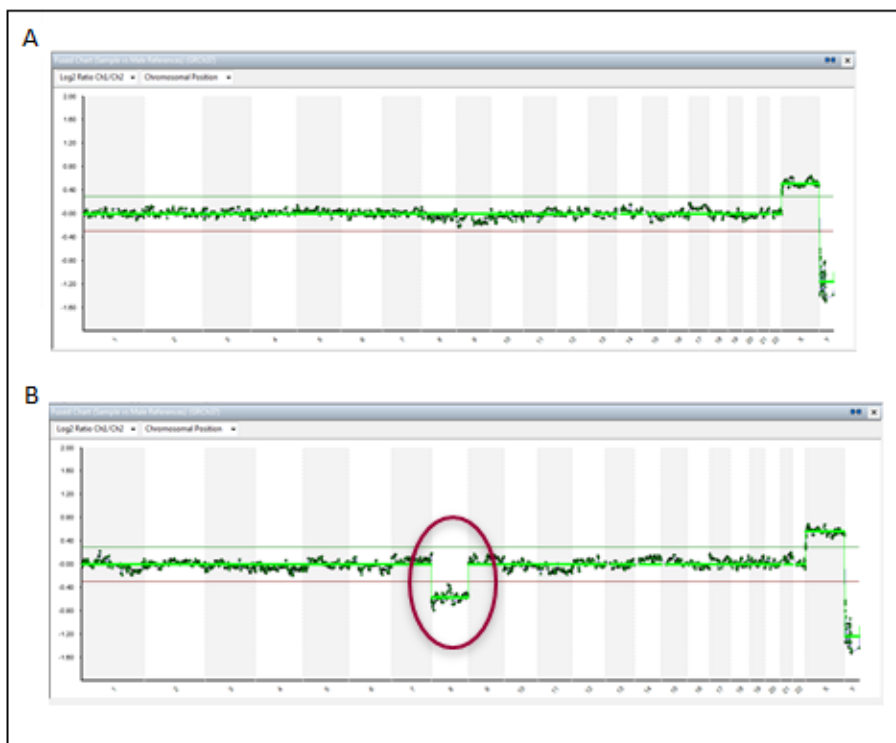
<b>9ei jdcg'</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Termociclador.</li> <li>- Campana de flujo laminar con luz ultravioleta.</li> <li>- Congelador a -20°C.</li> <li>- Nevera a 4°C.</li> </ul>

- Gradilla refrigerada de 0 a 4°C (puede sustituirse por un pequeño recipiente con hielo).
- Baño termostático.
- Vórtex.
- Termobloque.
- Centrífuga para tubos de 1.5 ml y de 0.2 ml.
- Cubetas de vidrio de 50 ml.
- Agitador magnético.
  - Cámara de hibridación.
  - Scanner para lectura de las señales del array (específico según plataforma utilizada).

**Figura 6.** Representación gráfica de los resultados de array de CGH en célula única mostrando:

A) perfil característico de una célula euploide con cariotipo 46,XX;

B) perfil correspondiente a una célula aneuploide con cariotipo 45,XX,-8.



**: i b[ JVY**

Tubos de PCR de 0.2 ml.

- Tubos de 1.5 ml.

- Tampón de lisis alcalina: 200 mM KOH/50 mM ditioneitol ó 200 mM NaOH/50 mM ditioneitol.

- Tampón de neutralización (900 mM Tris-HCl, pH 8.3/300 mM KCl/200 mM HCl).

- Cebadores (depende del método usado y/o del Kit comercial).

- Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs).

- ADN polimerasa Taq, con su propio tampón (para PEP y DOP-PCR).

- ADN polimerasa Phi 29, con su propio tampón (para MDA).

- Kit de marcaje (incluye enzima Klenow, dCTPs marcados con Cy3 y con Cy5, cebadores y tampón de la enzima, así como EDTA).

- Columnas de purificación de ADN.

- Acetato de sodio 3M.

- COT Human DNA.

- Etanol al 70% y etanol absoluto.

- Cubreobjetos de cristal de 22x22 milímetros.

- Portaobjetos que contengan el array.

- Tampón de hibridación.

**Gc`i WjcbYg`****20 x SSC (Citrato Sódico Salino)**

Para 250 ml: 66 gr de SSC stock+ 250 ml de agua tridestilada.

- Ajustar el pH a 7.0.
- Filtrar la solución con un filtro de 0.45 µm de poro y almacenar a temperatura ambiente.

**2 x SSC**

Para 1000 ml: 100 ml de 20xSSC + 900 ml de agua tridestilada. Almacenar a temperatura ambiente.

**2 x SSC/50% Formamida**

Para 6 ml: 3 ml de 2xSSC + 3 ml de Formamida.

**2 x SSC/0,05% Tween20**

Para 1000 ml: 100 ml de 20xSSC + 899,5 ml de agua tridestilada + 0,5 ml de Tween20.

- Almacenar a temperatura ambiente.



- Introducir los tubos en el termociclador a 37°C. La reacción de marcaje puede durar de 2 a 5 horas.

#### **Di f J V U M J O B ' X Y 5 8 B '**

- Rotular un tubo de 1.5 ml con el nombre de cada muestra.
- Preparar una columna de purificación de ADN por muestra.
- Colocar cada columna en uno de los tubos de 1.5 ml rotulados.
- Extraer los tubos del termociclador y detener la reacción de marcaje añadiendo 2.5 µl de EDTA en cada tubo.
- Pasar cada muestra por la columna del tubo marcado con el número de muestra correspondiente.
- Añadir a cada muestra el contenido de uno de los tubos marcados con "Cy5". Homogeneizar con la punta de la pipeta.
- Añadir 25 µl de COT Human DNA y 7.5 µl de acetato de sodio 3M a cada tubo y dar vórtex.
- Añadir 187.5 µl de etanol absoluto. Mezclar por inversión.
- Precipitar el ADN durante 1 hora a -20°C ó 30 minutos a -80°C ó 10 minutos en hielo seco.

#### **< J V f J X U M J O B ' g c V f Y Y ' U f f U m i**

- Centrifugar 10 minutos a máxima velocidad los tubos con ADN precipitado.
- Descartar el sobrenadante, añadir 500 µl de etanol 70% y mezclar por inversión.
- Descartar el sobrenadante y, sin levantar el tubo, presionar sobre una servilleta. Dejar secar el tubo sin tapar sobre la servilleta.
- Resuspender el J ^ / ^ cen 21 µl de tampón de hibridación.
- Desnaturalizar 10 minutos a 75°C en un termobloque.
- Añadir 6 ml de 2xSSC/50% formamida a la cámara de hibridación.
- Pipetear 18 µl de cada muestra en un cubreobjetos y posicionarlo sobre el array.
- Colocar los portaobjetos en la cámara de hibridación, sellar con cinta aislante e introducir en el baño de 8 a 16 horas.

#### **@ J U X c g ' d c g h \ J V f J X U M J O B '**

- Extraer los portaobjetos de la cámara de hibridación, introducirlos en una jarra coplin con solución 2xSSC/0,05% Tween 20 a temperatura ambiente, y eliminar los cubreobjetos por deslizamiento.

- Pasar los portaobjetos a una cesta, e introducirla en una cubeta de lavado con 2xSSC/0,05% Tween20 durante 10 minutos a temperatura ambiente y con agitación.
- Pasar la cesta a una cubeta con 1xSSC durante 5 minutos a temperatura ambiente y con agitación.
- Pasar la cesta a una cubeta con 0,1xSSC durante 5 minutos a 59°C sin agitación.
- Pasar la cesta a una cubeta con 0,1xSSC durante 1 minuto a temperatura ambiente y con agitación.
- Secar los portaobjetos por centrifugación a 170g durante 3 minutos y almacenarlos a temperatura ambiente hasta su lectura. ´

**@Mfi fUY`bhfdfYUMQb`XYfYgi`HUXcg´**

Se necesita un scanner equipado con láser de dos canales, un canal verde (532 nm) para la excitación y lectura de la señal Cy3, y un canal rojo (635 nm) para la excitación y lectura de la señal Cy5:

- Realizar un pre-escaneo y ajustar la lectura al área de hibridación del array.
- Escanear el área de hibridación, ajustar la potencia del láser de ambos canales de manera que se obtenga una intensidad de señal similar para Cy3 y Cy5, y seleccionar los parámetros de escaneo (tamaño del píxel, velocidad y modalidad) según recomendaciones de la casa comercial de la plataforma utilizada.
- Guardar las imágenes TIFF generadas por el scanner y analizarlas con un programa informático de análisis de datos específico para array de CGH. Dicho programa normaliza las intensidades de fluorescencia de los canales Cy3 y Cy5, y genera un gráfico que representa la cantidad de ADN de la muestra respecto del ADN control (eje Y) para cada uno de los 24 cromosomas (eje X). La "ganancia o pérdida" de material genético en Cy3 se representa por puntos que se desvían hacia la parte superior o inferior del gráfico, respectivamente (Figura 2). ´





porcentaje de embriones transferidos que resulta en un saco gestacional. La tasa de embarazo por transferencia se calcula como el porcentaje de embarazos clínicos con un latido del corazón fetal. La tasa de aborto se definió como el porcentaje de embarazos clínicos que se abortó espontáneamente antes de la semana 12 del embarazo. La tasa de parto por ciclo se define como el número de ciclos que terminó en un nacimiento vivo.  $P < 0,05$  fue considerado como estadísticamente significativo para ambos estudios.



( "F9GI @H58CG



## 4.1. ESTUDIO RANDOMIZADO DE PGS-FISH EN CASOS DE FALLO DE IMPLANTACIÓN

### 4.1.1. Resultados del ciclo de FIV y de anomalías cromosómicas

En el primer estudio se incluyeron un total de 91 parejas con al menos 3 fallos de implantación que completaron su tratamiento y cumplieron los criterios descritos en el diseño del estudio prospectivo randomizado.

Se compararon los resultados de la estimulación y de diferentes variables del ciclo de FIV y del desarrollo embrionario, así como de las anomalías cromosómicas observadas en el ciclo de PGS. Las comparaciones entre los grupos del estudio de PGS-FISH se resumen en las Tablas 1 y 2. Edad media, nivel medio de E2 al día de hCG, número medio de ovocitos (MII) obtenidos, número medio de embriones transferidos, número medio de blastómeros en día 3 y grado medio de fragmentación en día 3 fueron similares entre los dos grupos.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas sólo en el número medio de días de estimulación, que fue mayor en el grupo de PGS (11,0 vs. 9,9;  $p=0,0051$ ), y en el número de ciclos de FIV fallidos anteriores, lo que fue mayor en el grupo de PGS (3,5 vs. 3,1;  $p = 0,0039$ ).

Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de pacientes que tuvieron al menos un embrión normal para la transferencia (83,7% vs. 89,6% en los grupos A y B, respectivamente) (Tabla 1). Sólo un embrión euploide fue detenido en el estadio de división, y para este ciclo había dos embriones excedentes disponibles para la transferencia.

**Tabla 1.** Descripción de los parámetros de los grupos del estudio randomizado de PGS-FISH en pacientes de FI.

	Grupo blastocisto (Grupo A)	Grupo PGS-FISH (Grupo B)	<i>Uc f'XY'</i> <i>D</i>
Número de pacientes	43	48	–
Edad media $\pm$ DS	35,3 $\pm$ 2,9	35,2 $\pm$ 3,5	NS
Numero de ciclos iniciados	43	48	–
Nivel de E2 al día de hCG (pg/mL) $\pm$ DS	1768 $\pm$ 567,5	2062 $\pm$ 1145,3	NS
Días de estimulación $\pm$ DS	9,9 $\pm$ 1,6 <sup>a</sup>	11,0 $\pm$ 2,0 <sup>a</sup>	0,0051
Numero de ciclos de FIV fallidos anteriores $\pm$ DS	3,1 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	3,5 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	0,0039
Numero de ovocitos de MII obtenidos $\pm$ DS	9,9 $\pm$ 4,7	11,0 $\pm$ 5,8	NS
Embriones anormales/informativos (%)	–	152/265 (57,3)	–
Número de transferencias (%)	36 (83,7)	43 (89,6)	NS
Número de embriones transferidos $\pm$ DS	1,9 $\pm$ 0,7	1,7 $\pm$ 0,6	NS
Número de blastómeros en día 3 $\pm$ DS	7,8 $\pm$ 1,3	8,2 $\pm$ 1,2	NS
Grado de fragmentación en día 3 $\pm$ DS	6,1 $\pm$ 4,6	4,8 $\pm$ 5,0	NS

NS: No Significante; <sup>a</sup> y <sup>b</sup> indican diferencias estadísticas significativas.

El porcentaje de embriones anormales en el grupo de PGS-FISH fue de 57,3%, con tasas de aneuploidías por cromosoma: 9,8% para el cromosoma 13; 5,7% para el cromosoma 15; 9,4% para el cromosoma 16; 2,3% para el cromosoma 17; 7,9% para el cromosoma 18; 9,1% para el cromosoma 21; 9,8% para el cromosoma 22 y del 7,9% para los cromosomas sexuales (Tabla 2). Los porcentajes de embriones en día 3 que llegaron al estadio de blastocisto fueron similares en ambos grupos (64,1% y 61,7%, respectivamente, en los grupos A y B).

**Tabla 2.** Porcentaje de aneuploidías por cromosoma en el grupo de PGS-FISH.

Cromosomas analizados	Porcentaje de aneuploidías
Cromosoma 13	9,8%
Cromosoma 15	5,7%
Cromosoma 16	9,4%
Cromosoma 17	2,3%
Cromosoma 18	7,9%
Cromosoma 21	9,1%
Cromosoma 22	9,8%
Cromosomas sexuales	7,9%

#### 4.1.2. Resultados clínicos

Con respecto a los resultados clínicos, la tasa de embarazos por transferencia fue mayor en el grupo PGS-FISH en comparación con el grupo de blastocisto, mostrando diferencias estadísticamente significativas (36,1% vs. 62,8,  $p=0,024$ ; respectivamente, en los grupos A y B) (Tabla 3). La tasa de abortos espontáneos en ambos grupos fue similar (7,7% vs. 14,8; respectivamente, en los grupos A y B). La tasa de nacido vivo por paciente fue de 27,9% en el grupo A y se incrementó a 47,9% tras la aplicación de PGS-FISH en el grupo B, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa debido al limitado número de pacientes incluidas (Tabla 3).

Un total de 14 y 12 ciclos tuvieron al menos un blastocisto vitrificado en los grupos A (48 blastocistos vitrificados) y B (25 blastocistos vitrificados) (Tabla 3). En cada uno de los grupos se realizaron siete ciclos de descongelación, consiguiéndose dos embarazos evolutivos. En los casos restantes no se realizaron transferencias adicionales de embriones congelados, debido principalmente a la obtención de embarazo evolutivo tras la primera transferencia. Teniendo en cuenta las gestaciones totales conseguidas tras los ciclos con transferencia en fresco más las transferencias de

embriones congelados, las tasas de gestación evolutiva acumuladas por paciente fueron 32,6% (14/43) y 52,1% (25/48) en los grupos A y B, respectivamente, sin observarse tampoco diferencias significativas.

**Tabla 3.** Resultados clínicos del estudio randomizado de PGS-FISH en pacientes de FI.

	Grupo blastocisto (Grupo A)	Grupo PGS (Grupo B)	<i>JUcf'XY'</i> <i>D</i>
Número de embarazos/transferencia (%)	13/36 (36,1%)	27/43 (62,8%)	0,0243
Número de abortos espontáneos (%)	1 (7,7%)	4 (14,8%)	NS
Número de embarazos evolutivos/transferencia (%)	12/36 (33,3%)	23/43 (53,5%)	NS
Tasa de implantación evolutiva (%)	15/70 (21,4%)	26/71 (36,6%)	NS
Tasa de nacido vivo/paciente (%)	12/43 (27,9%)	23/48 (47,9%)	NS
Número de gestaciones gemelares (%)	3 (25,0%)	3 (13,0%)	NS
Numero de ciclos con blastocistos vitrificados	14	12	–
Numero de ciclos descongelados	7	7	–
Embarazos evolutivos con transfer de blastocistos descongelados	2	2	–
Número total embarazos en curso/paciente (%)	14/43 (32,6%)	25/48 (52,1%)	NS

pÜMÁ[ Áä} ääæä[





El aumento en la incidencia de anomalías cromosómicas con la edad materna se reflejó en una disminución en el porcentaje de ciclos con transferencia de al menos un embrión normal. En el grupo de mujeres de menor edad (<40 años), el 75,5% de los ciclos se resultó en una transferencia, mientras que esta tasa se redujo a sólo 37,8% en las mujeres mayores de 40 años (Tabla 5). La tasa de embarazo también fue más elevada en el grupo de pacientes menores de 40 años en comparación con el grupo de mayor edad (52,6% y 41,5%, respectivamente), aunque las tasas de aborto fueron similares (Tabla 5).

**Tabla 5.** Resultados clínicos en función de la edad materna.

	< 40 años	≥ 40 años	Total
<b>Numero de ciclos</b>	274	217	491
<b>Edad media ± DS</b>	36,4± 2,6	41,2± 2,0	38,5± 2,5
<b>% ciclos con transferencia</b>	75,5% <sup>a</sup>	37,8% <sup>a</sup>	58,8%
<b>Número medio de embriones transferidos ± DS</b>	1,5± 0,5	1,3± 0,5	1,5± 0,5
<b>Tasa de embarazo</b>	52,6%	41,5%	49,5%
<b>Tasa de implantación</b>	45,7%	36,1%	43,0%
<b>Tasa de Aborto</b>	9,2%	2,9%	7,7%

æV^•oO@R ææ/ææ/ ÁŁŁÉÍ Á

#### 4.2.2. Resultados en función del número de fallos previos de FIV

Los resultados clínicos también se evaluaron según el número de fallos de implantación anteriores, en este análisis sólo se incluyeron el grupo de pacientes menores de 40 años (Tabla 6). El porcentaje de embriones anormales no se vio afectado por el número de fallos de implantación anteriores (71,9% con 2 fallos y 69,5% con ≥ 6 ciclos anteriores), pero se notó una disminución en el porcentaje de embriones con un

patrón de división caótico (de 18,6% con 2 fallos a 8,5% con  $\geq 6$  ciclos anteriores). Con ello, llegamos a la conclusión de que el resultado clínico o las posibilidades de un embarazo a término no se ven afectados por el número de ciclos fallidos anteriores (Tabla 6).

#### 4.2.3. Resultados en función de la concentración de espermatozoides

La contribución de la concentración de espermatozoides en los resultados clínicos de los ciclos de FI se muestra en la Tabla 7; solamente los ciclos de pacientes menores de 40 años fueron considerados. Se observaron mayores tasas de embarazo e implantación en los ciclos en los que la concentración de espermatozoides fue menor de 10 millones/ml. Sin embargo, el porcentaje de embriones cromosómicamente anormales fue similar para diferentes concentraciones de espermatozoides (Tabla 7). Estos resultados podrían indicar que cuando existe un factor de calidad seminal como una posible causa de la mala implantación en ciclos de FIV convencionales, la selección de embriones cromosómicamente normales para la transferencia puede ser capaz de mejorar las tasas de embarazo a más de 60,0%.

**Tabla 6.** Resultados clínicos en función del número de ciclos de FIV fallidos anteriores.

	Número de ciclos de FIV anteriores				
	2 ciclos	3 ciclos	4 ciclos	5 ciclos	$\geq 6$ ciclos
<b>Tasa de transferencia (%)</b>	73,7%	72%	84,2%	76%	73,9%
<b>Tasa de embarazo (%)</b>	58,9%	49,2%	52,8%	52,6%	52,9%
<b>Tasa de implantación (%)</b>	50,5%	44,9%	44,3%	44,8%	37%
<b>Tasa de aborto (%)</b>	6,1%	6,1%	20%	10%	0%

ÜMÄ[ Ää} äää[

**Tabla 7.** Resultados clínicos según la concentración de espermatozoides.

	Concentración de espermatozoides			
	<5 mill/ml (n=42 ciclos)	5-10 mill/ml (n=33 ciclos)	11-20 mill/ml (n=42 ciclos)	≥20 mill/ml (n=157 ciclos)
<b>Tasa de transferencia</b>	73,8%	75,7%	73,8%	76,4%
<b>Tasa de embarazo</b>	61,3%	64%	45,2%	50%
<b>Tasa de implantación</b>	53,5%	52,6%	41,3%	43,6%
<b>Tasa de aborto</b>	15,8%	0%	0%	5%

#### 4.2.4. Resultados en función del número de ovocitos MII recuperados

El número de ovocitos de metafase II (MII) también puede contribuir a los resultados clínicos de los pacientes con FI. En pacientes menores de 40 años, la principal limitación de la reducción del número de ovocitos de MII fue un menor número de ciclos que tuvieron transferencia embrionaria: en pacientes con menos de 5 ovocitos MII se transfirieron embriones en 60% de los ciclos, mientras que cuando se recuperaron más de 16 ovocitos MII, este porcentaje fue superior al 90% (Tabla 8).

Sin embargo, el porcentaje de embriones anormales, las tasas de embarazo y aborto espontáneo fueron similares independientemente del número de ovocitos de MII obtenidos. El parámetro más afectado por el número de ovocitos de MII fue la tasa de transfer por ciclo y, por tanto, la tasa de embarazo por ciclo. La tasa de embarazo por ciclo se vio significativamente disminuida en casos ≤10 ovocitos MII en comparación con el grupo de pacientes con más de 10 MII (33,6% y 46,8%, respectivamente;  $p = 0,03$ ) (Tabla 8).

**Tabla 8.** Resultado clínico según el número de ovocitos de MII obtenidos.

	Número de ovocitos MII				
	≤5 MII (n=25 ciclos)	6-10 MII (n=109 ciclos)	11-15 MII (n=89 ciclos)	16-20 MII (n=33 ciclos)	≥20 MII (n=17 ciclos)
<b>Tasa de transferencia</b>	60%	69,7%	78,6%	90,9%	88,2%
<b>Tasa de embarazo</b>	60%	44,7%	55,7%	56,7%	60%
<b>Tasa de implantación</b>	55%	42,6%	45,9%	74,2%	52%
<b>Tasa de aborto</b>	0	14,7%	7,7%	11,7%	0



) "8=G7I G=é B'; 9B9F5 @





La definición de fallo repetido de implantación (FI) se refiere a la imposibilidad de lograr un embarazo clínico después de tres o más intentos de FIV, o tras la transferencia de 10 o más embriones de buena calidad sin conseguir gestación. Las causas del fallo de implantación pueden ser múltiples, tanto factores endometriales como factores embrionarios e inmunológicos podrían estar implicados (Coughlan <sup>^</sup>^<sup>^</sup>2014).

El tratamiento de FIV es un proceso complejo y en condiciones ideales la probabilidad de éxito había oscilado en los últimos años entre un 20-30% por ciclo (Evers, 2002; Taylor, 2003). Uno de los factores más importantes que explicaba esta gran ineficiencia del proceso reproductivo en la especie humana es la existencia de gran número de alteraciones cromosómicas embrionarias. Asimismo, las aneuploidías cromosómicas, o modificaciones en el número de cromosomas en los embriones, se reconocen como un factor significativo que contribuye al fallo de implantación y abortos espontáneos (Hassold <sup>^</sup>^<sup>^</sup>2001; Lathi <sup>^</sup>^<sup>^</sup>2008; Norwitz <sup>^</sup>^<sup>^</sup>2001; Steer <sup>^</sup>^<sup>^</sup>1989). De acuerdo con ello, los estudios de PGS en diferentes grupos de pacientes sometidos a FIV han demostrado que un porcentaje importante de los embriones tienen alteraciones cromosómicas (Harper <sup>^</sup>^<sup>^</sup>1995; Munné <sup>^</sup>^<sup>^</sup>1998). Aproximadamente tres de cada cuatro embriones contiene alteraciones cromosómicas de origen, bien meiótico, producidas durante la formación de los gametos, o mitótico (postzigótico), ocurridas tras la fecundación. Asimismo, los porcentajes de aneuploidías son más altos en los ovocitos y embriones de las mujeres de edad avanzada (Hassold <sup>^</sup>^<sup>^</sup>1980; Rubio <sup>^</sup>^<sup>^</sup>2013) y probablemente se debe a defectos de recombinación meióticas exacerbados por la edad (Lamb <sup>^</sup>^<sup>^</sup>1996). Las anomalías cromosómicas observadas en los embriones creados en FIV y en los abortos espontáneos son principalmente anomalías numéricas (95% del total) que se producen en parejas con cariotipos normales. Las alteraciones o anomalías cromosómicas embrionarias podrían ser responsables del fallo de implantación en algunas de estas parejas.

Un estudio reciente de la Universidad de Stanford, sugiere que además de la edad materna existen otros factores genéticos que influyen en la producción de embriones con anomalías cromosómicas (McCoy *et al.* 2015). McCoy *et al.* llevaron a cabo un estudio de asociación del genoma completo en el que evaluaron el riesgo a generar embriones con aneuploidías en parejas que realizaron un ciclo de PGS. Así, el ADN parental fue analizado para identificar las variantes genéticas de un solo nucleótido (SNPs) y los embriones fueron evaluados sobre la presencia de aneuploidías de origen meiótico o mitótico. Los resultados del análisis mostraron una región genómica en el cromosoma 4 asociada a los defectos en el número de cromosomas en los embriones, e indican que las mujeres portadoras de variantes genéticas específicas localizadas en dicha región tienden a producir embriones con mayor número de aneuploidías mitóticas (las que se producen tras la fecundación y durante las primeras divisiones del embrión), independientemente de la edad. La región cromosómica de riesgo incluye al gen *USP4* (*Ú[ [ [ Ēā^Áĭ ā æ^Áĭ*), al que señalan los investigadores como principal responsable debido a su participación en la segregación de los cromosomas durante la división celular como componente del ciclo del centrosoma. Además, las madres con los genotipos de mayor riesgo respecto a las aneuploidías tenían menos embriones disponibles para el análisis indicando que la supervivencia en las etapas tempranas del desarrollo de sus embriones se veía comprometida por la presencia de aneuploidías. Sorprendentemente, la principal variante genética identificada es muy común en las poblaciones humanas lo que plantea cómo un cambio genético asociado a una menor fertilidad se ha mantenido en la especie. La región cromosómica en la que se encuentra, presenta marcas de deriva selectiva en la historia evolutiva de la especie por lo que los investigadores argumentan que su mantenimiento en las poblaciones humanas se debe a selección positiva o a haber sido arrastrada la variante con la región genómica que la ha sufrido. Los resultados de este estudio tienen importantes implicaciones en el

contexto de la fecundación  $\tilde{A} \tilde{a}$ , especialmente en casos de fallo repetido de implantación, ya que corroboraría la hipótesis de que algunas pacientes tendrían una predisposición genética para generar embriones aneuploides y en estos casos su identificación permitiría indicar PGS en los casos encontrados para la selección de embriones carentes de aneuploidías. En un futuro cercano, es muy probable que se descubran otras variantes genéticas que también puedan ayudar a explicar los mecanismos de las aneuploidías y la alta incidencia de anomalías cromosómicas en algunos grupos de pacientes.

### 5.1. PGS Y ESTUDIOS USANDO LA TECNICA FISH.

La técnica de PGS ofrece a las pacientes de FIV una herramienta de selección adicional, junto con las características morfológicas embrionarias (Ebner <sup>1999</sup>; Munné <sup>2010</sup>). Su objetivo es mejorar la selección de embriones más competentes para la transferencia, mediante la identificación y selección de embriones cromosómicamente normales (euploides) con el fin de incrementar la probabilidad de implantación y embarazo evolutivo, reducir el tiempo para lograr el embarazo, disminuir la incidencia de aborto involuntario y reducir el riesgo de una aneuploidía en recién nacidos (Wilton, 2002).

El empleo del PGS se asoció con mejores tasas de implantación y menores tasas de aborto (Gianaroli <sup>1999</sup>; Munné <sup>2003</sup>; Munné <sup>2006</sup>) lo cual propició una gran extensión de la técnica a finales de los 90. Se utilizó PGS-FISH en diversas indicaciones como pacientes de edad materna avanzada, factor masculino severo, abortos de repetición y fallo de implantación (Vidal <sup>1998</sup>; Pellicer <sup>1999</sup>; Rubio <sup>2003</sup>; Rubio <sup>2005</sup>; Simón <sup>1998</sup>; Pehlivan <sup>2003</sup>). En estos casos de mal pronóstico se observó una incidencia aumentada de alteraciones

cromosómicas. Los autores llegaron a la conclusión de que PGS podría ayudar a seleccionar los embriones euploides y discernir de aquellos que no lo son.

La mayoría de los estudios retrospectivos iniciales de PGS, realizando biopsias de uno o dos blastómeros en día 3 y el uso de la técnica FISH dieron resultados favorables (Vidal <sup>^</sup>~~^~~<sup>^</sup>1998; Pellicer <sup>^</sup>~~^~~<sup>^</sup>1999; Rubio <sup>^</sup>~~^~~<sup>^</sup>2003; Pehlivan <sup>^</sup>~~^~~<sup>^</sup>2003). Posteriormente, en contradicción con los estudios iniciales, se publicaron los estudios prospectivos randomizados que no mostraron la misma tendencia. Estos estudios prospectivos no mostraron una mejora en las tasas de niño en casa con el uso de PGS-FISH (Mastenbroek <sup>^</sup>~~^~~<sup>^</sup>2007; Blockeel <sup>^</sup>~~^~~<sup>^</sup>2008; Debrock <sup>^</sup>~~^~~<sup>^</sup>2010; Hardarson <sup>^</sup>~~^~~<sup>^</sup>2008; Mastenbroek <sup>^</sup>~~^~~<sup>^</sup>2011). Sin embargo, en un RCT posterior de Rubio et al. describieron un aumento significativo en las tasas de nacidos vivos en mujeres de edad avanzada (Rubio <sup>^</sup>~~^~~<sup>^</sup>2013). Una de las posibles razones de estos resultados diferentes se ha atribuido a las limitaciones conocidas de la técnica de FISH que analiza las aneuploidías para un número limitado de cromosomas, seleccionando los que aparecían con mayor frecuencia en abortos espontáneos o en recién nacidos, pero que quizá no son las aneuploidías más relevantes en embriones tempranos (Fiorentino <sup>^</sup>~~^~~<sup>^</sup>2014). Efectivamente, esto puede resultar en la transferencia de embriones aneuploides para los cromosomas que no fueron analizados. Por lo tanto, esta reducida precisión diagnóstica de la tecnología FISH podría haber comprometido el potencial beneficio del PGS (Harper <sup>^</sup>~~^~~<sup>^</sup>2010).

Así pues, tras la publicación de estos estudios con resultados contradictorios surgió en los últimos años una importante controversia en torno a la exactitud diagnóstica y a la eficacia clínica de PGS-FISH. Para valorar el impacto clínico del PGS-FISH se deben tener en cuenta tres procesos clave: la realización de la biopsia embrionaria, la fijación del núcleo y el análisis mediante FISH. En la parte de biopsia y fijación, si la técnica no se realiza por profesionales expertos, sus beneficios pueden verse enmascarados por

el daño realizado al embrión (Rubio <sup>^</sup>1992; Munné <sup>^</sup>2010). En lo referente al diagnóstico cromosómico mediante FISH, la eficiencia de hibridación de las sondas utilizadas para FISH conviene conocer que no es del 100%, lo que implica que algunos de los embriones analizados sean calificados como no informativos para algunos de los cromosomas analizados y, por lo tanto, no puedan ser seleccionados para la transferencia (Manor <sup>^</sup>1996; Manor <sup>^</sup>1998). En este sentido, cabe destacar la importancia de una ronda adicional de hibridación con sondas teloméricas con el fin de reducir el número de embriones calificados de no informativos (Mir <sup>^</sup>2010; Uher <sup>^</sup>2009).

En un estudio retrospectivo realizado por nuestro grupo (Pehlivan <sup>^</sup>2003) publicamos los resultados preliminares de PGS-FISH en 49 pacientes de FI en comparación con nueve pacientes de control. Se observó una tasa significativamente alta de anomalías cromosómicas (67,4%) en el grupo de FI en comparación con los controles (36,3%). En un total de 57 ciclos, se observó una tasa de embarazo del 34,0% y una tasa de implantación del 19,8% en pacientes de FI en comparación con 33,3% y 24,1% en los pacientes de control sin problemas de fertilidad. Por lo tanto, los resultados de nuestro estudio preliminar sugirieron un efecto beneficioso de PGS-FISH combinado con la transferencia en estadio de blastocisto.

En el presente estudio prospectivo y randomizado de PGS-FISH, aunque no estadísticamente significativa, se ha detectado una tendencia a la mejora de las tasas de nacidos vivos con PGS en un grupo de pacientes de FI en los que se excluyeron otras causas. Las tasas de nacidos vivos por paciente con y sin PGS fueron 47,9% y 27,9%, respectivamente. Es importante destacar que en el grupo de estudio, los embriones no fueron afectados negativamente por el procedimiento de biopsia embrionaria como pudimos valorar por el desarrollo embrionario posterior, sin

disminución de las tasas de formación de blastocisto comparado con el grupo sin biopsia embrionaria, y por el incremento significativo de la tasa de implantación.

En el único RCT que investiga el papel de PGS-FISH en pacientes de FI publicado con anterioridad, los autores no detectaron una diferencia significativa en las tasas de implantación entre el grupo de PGS (21,4%) y controles (25,3%) (Blockeel <sup>et al</sup> 2008). Sin embargo, el número de embriones transferidos fue significativamente menor en el grupo de PGS-FISH (1,4 y 2,1, respectivamente). La discrepancia observada en estos dos estudios se puede atribuir a los diferentes criterios de inclusión, así como al número de blastómeros biopsiados y al número de cromosomas analizados. Por otra parte, el presente estudio fue de baja potencia, ya que el estudio tuvo que ser finalizado antes de completar el tamaño muestral inicialmente estimado, ya que se produjo el cambio tecnológico que permitió el análisis de 24 cromosomas mediante array de CGH. Por otro lado, dado los criterios estrictos de inclusión, sólo las pacientes con tres o más ciclos fallidos anteriores y con un exhaustivo estudio previo para descartar otras causas, la velocidad de reclutamiento e inclusión de pacientes fue muy lenta a lo largo de los años en los que se realizó el estudio.

Desde el estudio publicado por Mastenbroek <sup>et al</sup> (Mastenbroek <sup>et al</sup> 2007) que investigó el efecto de PGS-FISH en pacientes de edad materna avanzada, estos autores y otros han argumentado que la biopsia embrionaria realizada en día 3 y PGS pueden tener un impacto negativo en el desarrollo embrionario, potencial de implantación y, finalmente, sobre el resultado del ciclo. A raíz de esto y algunos otros estudios, el cribado de aneuploidías con PGS-FISH con el propósito de mejorar los resultados de FIV en pacientes de mal pronóstico se ha debatido ampliamente en el ámbito científico, con algunos autores a favor y otros en contra del procedimiento (Simpson, 2008; Rubio <sup>et al</sup> 2009; Cohen <sup>et al</sup> 2007; Fauser, 2008; Fritz, 2008; Mastenbroek <sup>et al</sup> 2008; Van Steirteghem, 2008; Hernández, 2009). La mayoría de los estudios RCT publicados hasta

la realización de nuestro estudio habían llegado a la conclusión de que no existía ningún efecto beneficioso de la PGS-FISH en el resultado del ciclo. Estos resultados animaron a algunos autores a desalentar a la comunidad científica de la inclusión de los pacientes en los programas de PGS-FISH debido a consideraciones éticas (Van Steirteghem, 2008; Hernández, 2009). Por otro lado, nuestro grupo y otros han argumentado que en la mayoría de estos estudios confluyeron importantes defectos metodológicos tales como la selección de cromosomas inadecuada para el análisis, la ausencia de reanálisis en los casos de diagnóstico dudoso, alto porcentaje de embriones no-informativos después de la biopsia, sorprendentemente alta tasa de aborto espontáneo después de PGS, biopsia en embriones con reducido número de blastómeros, procedimiento de biopsia inapropiado y la selección de los medios de cultivo subóptimo (Simpson, 2008; Rubio <sup>et al</sup> 2009; Cohen <sup>et al</sup> 2007).

Posteriormente, en un RCT realizado por nuestro grupo, se ha demostrado claramente que la biopsia del embrión en día 3 con PGS-FISH mejora significativamente la tasa de nacidos vivos en pacientes edad materna avanzada (Rubio <sup>et al</sup> 2013). Junto con la tendencia positiva observada en los pacientes de FI, en nuestra experiencia, creemos que PGS-FISH no es perjudicial para el desarrollo del embrión y el resultado del ciclo. Es evidente que, junto con una adecuada selección de pacientes, el rendimiento de los laboratorios de embriología y la genética juegan un papel importante en los resultados de este tipo de estudios. Los aspectos claves de los laboratorios son las condiciones del laboratorio y medios de cultivo, medio de biopsia y la técnica de biopsia de blastómeros, los análisis genéticos con rondas de hibridación adicionales y finalmente el número de cromosomas analizados.

## 5.2. PGS Y ESTUDIOS USANDO LA TÉCNICA ARRAY DE CGH

Aunque los resultados obtenidos en estudios prospectivos randomizados publicados hasta la fecha han cuestionado el beneficio que el PGS puede ofrecer a parejas con fallo de implantación o edad materna avanzada, todos estos estudios se han realizado utilizando la técnica de FISH (Mastenbroek <sup>^</sup>2007; Blockeel <sup>^</sup>2008; Debrock <sup>^</sup>2010; Hardarson <sup>^</sup>2008; Mastenbroek <sup>^</sup>2011). Entre otros aspectos, se ha propuesto que las limitaciones de la propia técnica de FISH, como son la eficiencia de hibridación, el número reducido de cromosomas que permite analizar en célula única, así como la subjetividad en la interpretación de los resultados, podrían estar influyendo negativamente en los resultados obtenidos por los RCTs. En este sentido, la técnica de array de CGH se presenta como una herramienta que permite analizar con mayor resolución y de modo más objetivo, alteraciones en los 24 cromosomas en una célula única.

En los últimos años, el interés se ha dirigido hacia las nuevas tecnologías que permiten una detección completa de 24 cromosomas o cariotipo completo para una evaluación más precisa de la viabilidad embrionaria. Se han desarrollado varios métodos para el análisis de 24 cromosomas y se encuentran actualmente disponibles para uso clínico, incluyendo array de CGH (Gutierrez-Mateo <sup>^</sup>2011; Fiorentino <sup>^</sup>2011; Rodrigo <sup>^</sup>2014; Rubio <sup>^</sup>2013), hibridación genómica comparativa de metafases (Fragouli <sup>^</sup>2006; Wilton <sup>^</sup>2003; Schoolcraft <sup>^</sup>2010), los microarray de SNPs (Treff <sup>^</sup>2010; Johnson <sup>^</sup>2010) y la PCR cuantitativa (Treff <sup>^</sup>2012).

Los arrays de CGH fue la primera tecnología ampliamente disponible para analizar el número de copias de los 24 cromosomas (Wells <sup>^</sup>2008). Este método utiliza la tecnología de microarray para el cribado de aneuploidías a través de su capacidad de detectar desequilibrios en cualquiera de los 24 cromosomas en lugar de la evaluación limitada alcanzable por FISH (Gutierrez-Mateo <sup>^</sup>2011; Fiorentino <sup>^</sup>2011; Wells



^öäÿ2008). Los datos iniciales de la aplicación clínica de PGS de 24 cromosomas mostraron que pueden ocurrir aneuploidías en cualquiera de los 24 cromosomas en embriones preimplantacionales, lo que indica que un PGS que incluya el análisis de los 24 cromosomas sería necesario para determinar si un embrión es cromosómicamente normal (Gutierrez-Mateo ^öäÿ2011; Fiorentino ^öäÿ2011; Treff ^öäÿ2010). Los primeros estudios también han mostrado una mayor consistencia entre los diferentes estudios (Gutierrez-Mateo ^öäÿ2011; Fiorentino ^öäÿ2011; Treff ^öäÿ2010; Johnson ^öäÿ2010), con una mejora en el diagnóstico de aneuploidías (Scott ^öäÿ2012; Northrop ^öäÿ2010) y alta tasa del embarazo después de la transferencia de embriones seleccionados como euploides (Fiorentino ^öäÿ2011; Schoolcraft ^öäÿ2010; Forman ^öäÿ2012; Fragouli ^öäÿ2010; Yang ^öäÿ2012; Scott ^öäÿ2013). Aunque estos resultados clínicos se han obtenido tras un análisis retrospectivo, diferentes grupos están llevando a cabo estudios prospectivos randomizados con las nuevas técnicas para evaluar las aneuploidías para los 23 pares cromosómicos. El único RCT publicado por Yang ^öäÿ (Yang ^öäÿ2012) propone además el uso clínico del PGS mediante array de CGH en pacientes de FIV de buen pronóstico, como método de selección embrionaria para la realización de transferencia de un único embrión frente a la selección de los embriones por criterios morfológicos. En este trabajo se describe una tasa de embarazo evolutivo de 41%, en los casos en los que se transfirieron blastocistos sin analizar, y del 69,1% en los casos en los que se realizó biopsia de blastocistos y análisis con array de CGH. En estos casos se realizó una transferencia, en el día 6 del mismo ciclo, de los embriones diagnosticados como normales. Para confirmar las nuevas posibilidades de la tecnología de array de CGH es necesario el desarrollo de nuevos estudios randomizados diseñados para diferentes indicaciones y también para diferentes estadios de biopsia, principalmente día 3 de desarrollo y para biopsia de blastocisto, tanto con transferencia en el mismo ciclo, como con vitrificación de los blastocistos tras

la biopsia y posterior transferencia en un ciclo no estimulado como proponen algunos autores (Scott <sup>^</sup>~~et al~~ 2013; Schoolcraft <sup>^</sup>~~et al~~ 2010).

En un reciente estudio retrospectivo y multicéntrico, Capalbo et al. detectó una relación moderada entre la morfología de blastocito y euploidia como se muestra mediante array de CGH (Capalbo <sup>^</sup>~~et al~~ 2014). La probabilidad de implantación de embriones transferidos parecía estar determinado principalmente por su constitución genética o cromosómica en lugar de los parámetros de desarrollo y morfología del blastocisto.

Con la introducción de nuevas tecnologías que proporcionaron resultados dentro de 24 horas y la posibilidad de estudiar todos los cromosomas, se produjo una renovación en la tecnología en la mayoría de los laboratorios de PGS. En un estudio inicial utilizando los array de CGH, nuestro grupo mostró elevadas tasas de embarazo e implantación en 188 ciclos de pacientes de FI (Rodrigo <sup>^</sup>~~et al~~ 2014). En este estudio, se detectaron anomalías cromosómicas en el 67,7% de los embriones en comparación con el 57,3% que obtuvimos en nuestro estudio randomizado de PGS-FISH y obtuvimos una alta tasa de implantación y de recién nacido vivo (50,9% y 43,1%) que apoyan la aplicación de cribado de aneuploidías con array de CGH en este grupo de pacientes.

Hasta la fecha no se ha realizado ningún RCT que aborde el uso del PGS de 24 cromosomas. Recientemente, Greco <sup>^</sup>~~et al~~ han reportado un estudio piloto utilizando array de CGH para la selección de blastocistos en pacientes de FI (Greco <sup>^</sup>~~et al~~ 2014). En este estudio, se compararon tres grupos de pacientes: 43 parejas con FI cuyos embriones fueron seleccionados con array de CGH (grupo FI - PGS), 33 parejas con FI que no se realizó PGS (grupo FI - sin PGS), y 45 parejas de buen pronóstico en los que se utilizó array de CGH para la selección de embriones (grupo no FI - PGS). En el grupo de grupo FI- sin PGS, 1 o 2 blastocistos fueron transferidos basados en la morfología y el desarrollo embrionario. Las tasas de embarazo clínico e implantación fueron similares

en el grupo de FI - PGS y pacientes de buen pronóstico que se sometieron a array CGH (grupo no FI-PGS) (68,3% y 70,5%, respectivamente). Por el contrario, se observó una tasa de embarazo clínico de 21,2% en los pacientes de FI en los que no se realizó PGS (grupo FI - sin PGS). Los autores concluyeron que el PGS con array de CGH y con transferencia de un solo blastocisto podría ser una estrategia exitosa para los pacientes con múltiples intentos fallidos de FIV.

De acuerdo con los resultados publicados por Greco <sup>^</sup>~~^~~ (Greco <sup>^</sup>~~^~~ 2014), los datos presentados en esta tesis también apuntan a una tendencia hacia un mejor resultado clínico tras el análisis de los 24 cromosomas. El uso de array de CGH parece mejorar la detección de anomalías cromosómicas y las tasas de implantación en mayor grado que la tecnología disponible anteriormente (FISH) en la que se podría analizar sólo un número limitado de cromosomas. En nuestro estudio randomizado de PGS-FISH sólo incluyendo las mujeres menores de 40 años de edad, se detectaron anomalías cromosómicas en 57,3% de los embriones y la tasa de implantación fue de 36,6%. Por otro lado, en nuestro de estudio de array de CGH, la incidencia de anomalías cromosómicas en las mujeres menores de 40 años y mayores de 40 años fueron de 69,4% y 88,1%, y las tasas de implantación fueron de 45,7% y 36,1%, respectivamente (en total de 49,5%).

Hemos evaluado los resultados clínicos según el número de fallos de implantación anteriores en pacientes menores de 40 años. El porcentaje de embriones anormales no se vio afectado por el número de ciclos anteriores (71,9% con 2 fallos y 69,5% con  $\geq 6$  ciclos anteriores) y llegamos a la conclusión de que el resultado clínico o las posibilidades de un embarazo a término no se ven afectados por el número de ciclos fallidos anteriores. Por otro lado, hemos observado mayores tasas de embarazo e implantación en los ciclos en los que la concentración de espermatozoides fue menor de 10 millones/ml. Aunque el porcentaje de embriones cromosómicamente anormales

fue similar para diferentes concentraciones de espermatozoides, cuando existe un factor de calidad seminal, la selección de embriones cromosómicamente normales puede ser capaz de mejorar las tasas de embarazo. El número de ovocitos en metafase II puede contribuir a los resultados clínicos de los pacientes con FI. En pacientes menores de 40 años, la principal limitación de la reducción del número de ovocitos de MII fue un menor número de ciclos que tuvieron transferencia embrionaria. En pacientes con menos de 5 ovocitos MII se transfirieron embriones en 60% de los ciclos, mientras que cuando se recuperaron más de 16 ovocitos MII, este porcentaje fue superior al 90%. Sin embargo, el porcentaje de embriones anormales, las tasas de embarazo y aborto espontáneo fueron similares independientemente del número de ovocitos de MII obtenidos. El parámetro más afectado por el número de ovocitos de MII fue la tasa de transferencia por ciclo y, por tanto, la tasa de embarazo por ciclo. La tasa de embarazo por ciclo se vio significativamente disminuida en casos  $\leq 10$  ovocitos MII en comparación con el grupo de pacientes con más de 10 MII (33,6% y 46,8%, respectivamente).

En un estudio realizado por Keltz <sup>44</sup> los autores también concluyeron que el PGS con array de CGH se asociaba a reducción en el número de los embriones transferidos, disminución de la tasa de embarazo múltiple y una tendencia hacia menores tasas de aborto espontáneo (Keltz <sup>44</sup> 2013). No obstante, se deben realizar estudios RCT en un futuro próximo para evaluar la eficacia y la viabilidad de las diferentes plataformas y estrategias de biopsia. Sólo después de estos estudios, tendremos suficientes evidencias para su uso generalizado en los programas de FIV y así, aumentar las tasas de nacidos vivos en pacientes de diferentes indicaciones, incluyendo FI.

### 5.3. PGS Y ESTUDIOS DE SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN (NGS)

El rápido desarrollo de tecnologías de secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing; NGS), ha generado un creciente interés en si NGS podría

aplicarse de manera fiable y si la técnica puede ofrecer alguna mejora en la detección de aneuploidías cromosómicas en los embriones, en comparación con las tecnologías de CCS actuales. El análisis de número de copias de cromosomas por NGS está basado en fragmentar el ADN embrionario amplificado en pequeños fragmentos (100-200 pares de bases). Cientos de miles de estos fragmentos son secuenciados en paralelo hasta que se adquiere una profundidad de secuenciación suficiente. Inicialmente, se compara los datos de la secuencia de los cromosomas en todo el genoma con el genoma de referencia, y a continuación se interpretan bioinformáticamente. Debido a que el número de secuencias de un cromosoma específico debe ser proporcional al número de copias, la trisomía o monosomía se traducirá en mayores o menores número de copias, respectivamente (Handyside <sup>^</sup>2013; Handyside, 2013). Con el uso de esta tecnología con blastómeros individuales o muestras de biopsias de trofoectodermo sería posible detectar aneuploidías cromosómicas y desequilibrios cromosómicos segmentarios (Yin <sup>^</sup>2013). Sin embargo, las nuevas tecnologías como NGS necesitan validación exhaustiva para determinar la exactitud preclínica comparado con métodos más establecidos, antes de que puedan considerarse dentro del estándar de atención en medicina reproductiva.

Recientemente, Fiorentino <sup>^</sup>2014 realizó un estudio de validación preclínica con el objetivo de evaluar la precisión de un protocolo de PGS basado en la técnica de NGS (Fiorentino <sup>^</sup>2014). Partiendo de un ensayo ciego, se evaluó la capacidad y precisión de NGS para la detección de aneuploidías utilizando células únicas en las que el cariotipo había sido previamente detectado por una metodología bien establecida. La especificidad de NGS para la detección de aneuploidía para un cromosoma (consistencia de asignación de número de copia de un cromosoma) fue del 99,98%, con una sensibilidad del 100%. La especificidad de NGS para la detección de un embrión aneuploide (consistencia diagnóstica de 24 cromosomas) fue del 100%, con una

sensibilidad del 100%. Todos los embriones diagnosticados como euploides por array de CGH se confirmaron como euploides con NGS, y todos los embriones diagnosticados como aneuploides por array de CGH fueron confirmados como aneuploides por NGS (100% consistencia diagnóstico para 24 cromosomas). Los autores de este estudio han concluido que NGS ha demostrado una sólida metodología de alto rendimiento listo para su aplicación clínica en medicina reproductiva, con posibles ventajas de reducción de costes y una mayor precisión. El protocolo de NGS utilizado en este estudio también mostró una detección precisa de las aneuploidías segmentarias (>14 Mb de tamaño), lo que indica que el diagnóstico de aneuploidías parciales se encuentra dentro de la capacidad de esta tecnología.

Además, la técnica NGS tiene la ventaja no sólo de la detección de aneuploidías, sino que también permitiría la evaluación simultánea de las alteraciones de un solo gen para la detección de las enfermedades monogénicas (Treff *et al.* 2013), translocaciones (Yin *et al.* 2013), y anomalías del genoma mitocondrial de la misma biopsia sin la necesidad de múltiples plataformas tecnológicas únicas.

Otra ventaja adicional, en comparación con array de CGH, es que no es necesario la co-hibridación de una muestra control. Es muy probable que NGS reduzca los costos por paciente, así que permitirá el uso más amplio de PGS para elegir el embrión más competente para transferir. Esta estrategia permitirá la transferencia de un solo embrión electivo y ayudará a reducir los embarazos múltiples y sus complicaciones asociadas obstétricas y neonatales. Por otra parte, no se puede lograr un potencial beneficio de coste si no hay suficientes muestras disponibles para aprovechar el máximo la capacidad de NGS, debido al alto coste de la tecnología utilizada.

Muy recientemente, Yang *et al.* han publicado el primer estudio clínico de una comparación randomizado del NGS con array de CGH sobre los resultados clínicos en pacientes de FIV (Yang *et al.* 2015). En la fase I de este estudio se evaluó la precisión

de NGS para el cribado de aneuploidías en comparación con el método de array de CGH. De forma retrospectiva, se analizaron con NGS los productos de genoma completa (WGA) ( $n = 164$ ) derivados de 38 ciclos anteriores de FIV. Al igual que los resultados de Fiorentino <sup>^44^</sup> se observó que la técnica de NGS da una consistencia para el diagnóstico de 24 cromosomas con una precisión de 100% comparado con el array de CGH (Fiorentino <sup>^44^</sup> 2014; Yang <sup>^45^</sup> 2015). En la fase II del este estudio, se compararon los resultados de embarazo clínico y de implantación entre NGS y array de CGH. Un total de 172 pacientes (edad media de  $35,2 \pm 3,5$  años) fueron randomizados en dos grupos. Grupo A incluyó 86 pacientes cuyos embriones fueron examinados con NGS y Grupo B incluyó 86 pacientes cuyos embriones fueron analizados con array de CGH. En ambos grupos, los blastocistos fueron vitrificados después de la biopsia del trofoectodermo. Se descongelaron uno o dos blastocistos euploides y se transfirieron a los pacientes basándose principalmente en los resultados de PGS. La técnica de NGS identificó blastocistos euploides para la transferencia y dio altas tasas de embarazo evolutivo, similares a las obtenidas con array de CGH (74,7% y 69,2%, respectivamente,  $p > 0,05$ ). Las tasas de implantación observadas también fueron comparables entre los grupos de NGS y array de CGH (70,5% y 66,2%, respectivamente,  $p > 0,05$ ).

#### **5.4. EL ADN MITOCONDRIAL (mtDNA) COMO UN BIOMARCADOR DE LA VIABILIDAD DEL EMBRIÓN**

Un componente importante para el desarrollo y viabilidad del embrión es el suministro de energía adecuada (Leese <sup>^46^</sup> 2012). La mayor parte de la energía celular deriva de la mitocondria. El contenido ADN mitocondrial (mtDNA) y la síntesis de trifosfato de adenosina se correlacionan bien en las células somáticas, pero este no es el caso en los ovocitos y embriones (Piko <sup>^47^</sup> 1987; Jansen <sup>^48^</sup> 1998; Reynier <sup>^49^</sup>

de 2001; Santos et al. 2006; Chappel, 2013; DiMauro et al. 2003; May-Panloup et al. 2007).

Los embriones dividen la cantidad total de mtDNA equitativamente entre todas las células durante la división celular. Estudios en ratones *mtDNA* han sugerido que el aumento excesivo en el contenido total de ADN mitocondrial o un aumento en la síntesis de mitocondrias podría estar asociado con una disminución en la función de las mismas. Un aumento en el número de copias del mtDNA en embriones tempranos puede ser indicativo de estrés metabólico y por lo tanto, el embrión trata de compensar dicho estrés incrementando el contenido de mtDNA. En consecuencia, el estrés energético del embrión puede inducir una maduración mitocondrial temprana, con el aumento de tamaño y número de copias de mtDNA para compensar una baja reserva de energía. Los métodos para detectar estos cambios podrían dar lugar a nuevas herramientas no invasivas para evaluar la calidad del embrión. El mtDNA se acumula en el ovocito maduro y pasa de sintetizar 10 copias en células germinales primordiales a  $10^5$  en ovocitos metafase II (Jansen et al. 1998). Basado en modelos de ratón, se ha sugerido que no se produce replicación adicional de mtDNA entre la fecundación y las etapas tempranas tras la implantación (Piko et al. 1987). Como resultado, la cantidad total de mtDNA se debe dividir entre las células durante la división embrionaria, y por lo tanto en el día 6 de desarrollo embrionario cada célula debe contener muy pocas copias de mtDNA. La enorme cantidad de mtDNA almacenado en el ovocito, y el hecho de que no se replica antes de la implantación, han llevado a la creencia de que el contenido de mtDNA en ovocitos se correlaciona positivamente tanto con la fecundación, como con la viabilidad del embrión. Lo que significa que podría ser utilizado como un biomarcador (Reynier et al. 2001; Santos et al. 2006; Chappel, 2013).

En un estudio retrospectivo, Díez-Juan et al. plantearon si podría considerarse el número de copias de mtDNA como un marcador de implantación o de embarazo (Díez-



Juan <sup>^</sup> ~~Acosta~~ (2015). Investigaron la relevancia clínica de la cantidad de mtDNA en embriones euploides procedentes de ciclos de PGS con transferencia de un solo embrión (270 pacientes), se examinaron el número de copias de mtDNA de 205 blastómeros obtenidas de embriones euploides en día 3, y 65 biopsias del trofoectodermo en estado del blastocisto, y 10 pacientes que tenían la transferencia de dos embriones (masculino y femenino). Posteriormente, se correlacionaron los niveles de mtDNA con tasas de implantación y embarazo para ver si embriones implantados tuvieron mayor o menor contenido de mtDNA. Los autores sugirieron que un número de copia alto de mtDNA en embriones euploides es indicativo de una menor viabilidad del embrión e implantación. Usando el contenido de mtDNA normalizado, los autores crearon un marcador mitocondrial o Mitoscore (Ms). Embriones de día 3 con <34 (MsA) tenían una tasa de implantación de 59% (n=51); aquellos con 34 a 52 (MsB) tuvieron una implantación de 44% (n=52); aquellos con 52 a 97 (MsC) tuvieron implantación de 42% (n=50); y aquellos con > 97 (MsD) tuvieron implantación de 25% (n=52). Los embriones con valores >160 (n=22) no implantaron. En día 5 los blastocistos con <18, F9 (MsA) tuvieron implantación de 81%; aquellos con 18,19 a 24,15 (MsB) tuvieron implantación de 50% (n=16); aquellos con 24,15 a 50,58 (MsC) tuvieron implantación de 62% (n=16); y aquellos con niveles >50,58 (MsD) tenían implantación de 18% (n=17). No implantaron ninguno de los embriones con niveles >60 (n=7). Los autores concluyeron que una mayor cantidad de mtDNA en embriones euploides se relaciona con una bajo potencial de implantación y esto puede ser indicativo de reserva metabólica reducida durante la maduración ovocitaria.

## 5.5. RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL

Mientras que la FIV ha revolucionado el tratamiento de la infertilidad, el proceso sigue siendo ineficiente. Un porcentaje importante de embriones morfológica y cromosómicamente normales no implantan. Por lo tanto, el endometrio o la receptividad endometrial parece ser el factor limitante y uno de los factores principales de las causas de ineficiencia del tratamiento de FIV, especialmente en casos de fallo de implantación repetida.

### 5.5.1. Daño mecánico endometrial (endometrial scratching)

Se ha propuesto que una lesión mecánica o daño endometrial causado por una biopsia endometrial (endometrial scratching) o histeroscopia en el ciclo anterior al de FIV o durante la estimulación ovárica pueda mejorar la implantación en casos de fallo de implantación inexplicable (Barash <sup>et al</sup> 2003; El-Toukhy <sup>et al</sup> 2012). Se ha postulado que una lesión local, provoca cambios en el endometrio que activa el sistema inmune y la expresión génica de moléculas, todo lo cual lleva a una mejor receptividad y que favorece la implantación (Gnainsky <sup>et al</sup> 2010; Dekel <sup>et al</sup> 2014).

Los estudios controlados iniciales de “endometrial scratching” o daño endometrial mostraron un aumento significativa (del doble) en la probabilidad de un embarazo clínico en comparación con la ausencia del mismo (Barash <sup>et al</sup> 2003; Potdar <sup>et al</sup> 2012; Raziel <sup>et al</sup> 2007; Karimzadeh <sup>et al</sup> 2009). Una meta-análisis reportado por Potdar et al. concluyó que la evidencia está claramente a favor de la inducción de daño local del endometrio en ciclo anterior de FIV para mejorar los resultados del embarazo en mujeres con FI (Potdar <sup>et al</sup> 2012). Por otro lado, revisiones sistemáticas y recientes estudios prospectivos y randomizados no confirmaron su eficacia (Yeung <sup>et al</sup> 2014; Panagiotopoulou <sup>et al</sup> 2015; Simón and Bellver, 2014). Aunque muchos centros de reproducción asistida en todo el mundo proponen esta herramienta a sus pacientes, son

necesarios estudios más consistentes y multicéntricos para que pueda estar justificado en la práctica clínica habitual. De momento, no existen suficientes datos para apoyar el uso de “endometrial scratching” en pacientes de FI sometidas a técnicas de reproducción asistida.

### 5.5.2. Array de receptividad endometrial (ERA)

Un endometrio es receptivo cuando está preparado para que tenga lugar la implantación del embrión, que generalmente se produce entre los días 19-21 del ciclo menstrual (días 5-7 post-ovulación). Este período de receptividad es lo que denominamos ventana de implantación. El método clásico de datación del estadio del endometrio se basa en criterios histológicos (Noyes <sup>^</sup>1975). Ese método se ha demostrado que no diferencia entre pacientes fértiles e infértiles y tiene un alto grado de subjetividad por lo que resulta en nula aplicación clínica.

Hasta hace poco, ningún marcador morfológico, molecular, o histológico había sido identificado para ser clínicamente útil con respecto a la evaluación de la receptividad del endometrio. El análisis transcriptómico del tejido endometrial humano ha dado un nuevo enfoque genómico que parece ser capaz de identificar la receptividad endometrial (Díaz-Gimeno <sup>^</sup>2011). Los investigadores de IGENOMIX han desarrollado un novedoso método diagnóstico de receptividad endometrial (Endometrial Receptivity Assay - ERA) tras más de 10 años de investigación (Díaz-Gimeno <sup>^</sup>2011; Garrido-Gómez <sup>^</sup>2013; Blesa <sup>^</sup>2014). Esta técnica sirve para evaluar el estadio del endometrio y determinar si presenta un perfil génico de receptividad o no en el momento de la realización de una biopsia endometrial. Se realiza la biopsia en la consulta en día LH+7 (en ciclo natural) o en día P+5 (ciclo sustituido) y luego se analiza la expresión de 238 genes implicados en la receptividad endometrial. En un microarray personalizado con sondas para estos 238 genes se hibrida una muestra de ARN obtenido del tejido

endometrial. Después de la hibridación se leen las intensidades de la señal y un predictor informático clasifica las muestras en función de su perfil de expresión como receptiva o no receptiva. Si lo es, significa que su ventana de implantación está localizada en el día en que se realizó la biopsia, y el embrión podrá implantarse en el útero en ese período. Un estado de no receptividad significa una ventana de implantación desplazada. Se procederá a repetir el procedimiento de acuerdo al predictor informático, que le dará la estimación de su ventana de implantación personalizada. Este análisis permite estimar el día más adecuado para la transferencia del embrión antes de comenzar un tratamiento de reproducción asistida (Díaz-Gimeno <sup>^44^</sup>2011; Garrido-Gómez <sup>^45^</sup>2013; Blesa <sup>^46^</sup>2014).

Este test ha sido probado en pacientes que han tenido fallo repetido de implantación (Ruiz-Alonso <sup>^47^</sup>2013). Se realizó un estudio clínico prospectivo de intervención en 85 pacientes de FI y 25 pacientes de control. El test de ERA dio un resultado receptivo en 74,1% en los pacientes de FI contra 88% en los pacientes control. El seguimiento clínico fue posible en 29 pacientes de FI, en los que se realizó la transferencia personalizada, lo que resultó en una tasa de embarazo de 51,7% y una tasa de implantación de 33,9%. Veintidós pacientes de FI (25,9%) fueron identificadas con endometrio no receptivo y en 15 de ellos un segundo test de ERA confirmó un desplazamiento de la ventana de implantación. En ocho de ellos, se realizó una transferencia personalizada en el día designado por el test ERA, lo que resultó en una tasa de embarazo del 50% y de implantación de 38,5%. En conclusión, este estudio preliminar ha demostrado que existe un mayor porcentaje de mujeres con una ventana de implantación desplazada en el grupo de pacientes de FI en comparación con el grupo control. Lo que lleva afirmar que una transferencia de embriones personalizada puede ser beneficiosa para estos pacientes mediante la modificación del día de la transferencia según el test de ERA. Con esta estrategia, es posible obtener tasas de embarazo e

implantación similares en mujeres que tienen un endometrio no receptivo o con una ventana de implantación desplazada mediante la realización de una transferencia personalizada. Si estudios prospectivos randomizados demuestran que esta estrategia es clínicamente beneficiosa, se podría aplicar a todas las pacientes de FIV y especialmente a las mujeres con FI.

En resumen, los tratamientos ofrecidos a parejas con fallo repetido de implantación de causa inexplicable deben estar basados en la evidencia, dirigidos a mejorar la calidad del embrión y la receptividad endometrial ya que son los dos factores implicados en este proceso. La biopsia embrionaria y el diagnóstico genético preimplantacional nos ofrecen la posibilidad de analizar la presencia de anomalías cromosómicas y genéticas en los embriones antes de ser transferidos al útero y por tanto antes de que se haya producido la implantación. En comparación con FISH, actualmente el array de CGH y las nuevas técnicas moleculares como la NGS han mejorado la capacidad de detección de aneuploidías cromosómicas en los embriones. Por supuesto, se necesitan más datos de estudios prospectivos y randomizados para determinar la importancia clínica y su papel en los ciclos de FIV con peor pronóstico como las pacientes de fallo repetido de implantación.



\* "7 CB7 @ G=CB9 G





1. Los criterios morfológicos para la selección de embriones no permiten seleccionar embriones cromosómicamente normales.
2. Los resultados obtenidos en nuestro estudio demuestran que las aneuploidías embrionarias pueden ser una causa importante de los casos de fallo de implantación. Se puede utilizar cribado genético preimplantacional para seleccionar y transferir embriones cromosómicamente normales para mejorar los resultados reproductivos en estas pacientes.
3. En nuestro estudio prospectivo y randomizado de PGS-FISH, aunque no estadísticamente significativa, se ha detectado una tendencia a la mejora de las tasas de nacidos vivos con PGS en un grupo de pacientes de con fallo repetido de implantación en los que se excluyeron otras causas.
4. Los embriones no se ven afectados negativamente por el procedimiento de biopsia embrionaria según su desarrollo posterior y las tasas de formación de blastocisto e implantación.
5. Las aneuploidías en embriones preimplantacionales pueden ocurrir en cualquiera de los 24 cromosomas. El porcentaje de embriones aneuploides es mayor cuando se analizan 24 cromosomas por array de CGH, en comparación con el cribado PGS-FISH con sólo 9 cromosomas.
6. El porcentaje de embriones anormales no es afectado por el número de fallos de implantación anteriores, así que el resultado clínico tampoco es afectado por el número de ciclos fallidos anteriores.
7. Se observan mayores tasas de embarazo e implantación en los ciclos en que la edad de la mujer es menor de 40 años, la concentración de espermatozoides es menor de 10 millones/ml y cuando se recupera más de 10 ovocitos de MII.



+ "6=6 @C; F5: ã



- Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Stevens J, Gutiérrez-Mateo C, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Wells D. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertil Steril* 2011; 95: 520-4.
- Aran B, Blanco J, Vidal F, Vendrell JM, Egozcue S, Barri PN, Egozcue J, Veiga A. Screening for abnormalities of chromosomes X,Y and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men participating in an in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection program. *Fertil Steril* 1999; 72: 696-701.
- Bajnóczyk K, Gardó S. "Premature anaphase" in a couple with recurrent miscarriages. *Hum Genet* 1993; 92: 388-90.
- Barash A, Dekel N, Fieldust S, Segal I, Schechtman E, Granot I. Local injury of the endometrium doubles the incidence of successful pregnancies in patients undergoing in-vitro fertilization. *Fertil Steril* 2003; 79: 1317–22.
- Barrenetxea G, López de Larruzea A, Ganzabal T, Jiménez R, Carbonero K, Mandiola M. Blastocyst culture after repeated failure of cleavage-stage embryo transfers: a comparison of day 5 and day 6 transfers. *Fertil Steril* 2005; 83: 49-53.
- Blake DA, Farquhar CM, Johnson N, Proctor M. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; 17; CD002118.
- Blesa D, Ruiz-Alonso M, Simón C. Clinical management of endometrial receptivity. *Semin Reprod Med*. 2014; 32: 410-3.
- Blockeel C, Schutyser V, De Vos A, Verpoest W, De Vos M, Staessen C, Haentjens P, Van der Elst J, Devroey P. Prospectively randomized controlled trial of PGS in IVF/ICSI patients with poor implantation. *Reprod Biomed Online* 2008; 17: 848-54.
- Capalbo A1, Rienzi L, Cimadomo D, Maggiulli R, Elliott T, Wright G, Nagy ZP, Ubaldi FM. Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation:



aneuploidy of embryos after in vitro fertilization in women aged at least 35 years: a prospective randomized trial. *Fertil Steril* 2010; 93: 364-73.

- Dekel N, Gnainsky Y, Granot I, Racicot K, Mor G. The role of inflammation for a successful implantation. *Am J Reprod Immunol* 2014; 72: 141-7.
- Díaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martínez-Conejero JA, Esteban FJ, Alamá P, Pellicer A, Simón C. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertil Steril* 2011; 95: 50-60.
- Díez-Juan A, Rubio C, Marín C, Martínez S, Al-Asmar N, Riboldi M, Díaz-Gimeno P, Valbuena D, Simón C. Mitochondrial DNA content as a viability score in human euploid embryos: less is better. *Fertil Steril* 2015; 104: 534-41.
- DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* 2003; 348: 2656–68.
- Dreesen J, Destouni A, Kourlaba G, Degn B, Mette WC, Carvalho F, Moutou C, Sengupta S, Dhanjal S, Renwick P, Davies S, Kanavakis E, Harton G, Traeger-Synodinos J. Evaluation of PCR-based preimplantation genetic diagnosis applied to monogenic diseases: a collaborative ESHRE PGD consortium study. *Eur J Hum Genet* 2014; 22: 1012-8.
- Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 251–62.
- Egozcue S, Blanco J, Vidal F, Egozcue J. Diploid sperm and the origin of triploidy. *Hum Reprod* 2002; 17: 5-7.
- Eichenlaub-Ritter U, Cucurkam S, Betzendahl I. Studies on the aneugenic properties of trichlorfon, a pesticide, vermicide and drug used in the treatment of Alzheimer patients. *Hum Reprod* 1999; 14: 240-1.

- El-Toukhy T, Sunkara S, Khalaf Y. Local endometrial injury and IVF outcome: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2012; 25: 345-54.
- Evers JL: Female subfertility. *Lancet* 2002; 360: 151-9.
- Fauser BC. Preimplantation genetic screening: the end of an affair? *Hum Reprod* 2008; 23: 2622–5.
- Fiorentino F, Biricik A, Bono S, Spizzichino L, Cotroneo E, Cottone G, Kokocinski F, Michel CE. Development and validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos. *Fertil Steril* 2014; 101: 1375-82.
- Fiorentino F, Spizzichino L, Bono S, Biricik A, Kokkali G, Rienzi L, Ubaldi FM, Iammarrone E, Gordon A, Pantos K. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. *Hum Reprod* 2011; 26: 1925–35.
- Fishel S, Gordon A, Lynch C, Dowell K, Ndukwe G, Kelada E, Thornton S, Jenner L, Cater E, Brown A, Garcia-Bernardo J. Live birth after polar body array comparative genomic hybridization prediction of embryo ploidy - the future of IVF? *Fertil Steril* 2010; 93: 1006.
- Forman EJ, Tao X, Ferry KM, Taylor D, Treff NR, Scott RT Jr. Single embryo transfer with comprehensive chromosome screening results in improved ongoing pregnancy rates and decreased miscarriage rates. *Hum Reprod* 2012; 27: 1217–22.
- Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Jaroudi S, Sarasa J, Enciso M, Wells D. The origin and impact of embryonic aneuploidy. *Hum Genet* 2013; 132: 1001-13.
- Fragouli E, Katz-Jaffe M, Alfarawati S, Stevens J, Colls P, Goodall NN, Tormasi S, Gutierrez-Mateo C, Prates R, Schoolcraft WB, Munne S, Wells D. Comprehensive chromosome screening of polar bodies and blastocysts from couples experiencing repeated implantation failure. *Fertil Steril* 2010; 94: 875–87.



- Fragouli E, Wells D, Whalley KM, Mills JA, Faed MJ, Delhanty JD. Increased susceptibility to maternal aneuploidy demonstrated by comparative genomic hybridization analysis of human MII oocytes and first polar bodies. *Cytogenet Genome Res* 2006; 114: 30-8.
- Fritz MA. Perspectives on the efficacy and indications for preimplantation genetic screening: where are we now? *Hum Reprod* 2008; 23: 2617–21.
- Garrido N, Bellver J, Remohí J, Alamá P, Pellicer A. Cumulative newborn rates increase with the total number of transferred embryos according to an analysis of 15,792 ovum donation cycles. *Fertil Steril* 2012; 98: 341-6.
- Garrido-Gómez T, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Diaz-Gimeno P, Vilella F, Simón C. Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results. *Fertil Steril* 2013; 99: 1078-85.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fiorentino A, Garrisi J, Munné S. Preimplantation genetic diagnosis increases the implantation rate in human in vitro fertilization by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos. *Fertil Steril* 1997; 68: 1128-31.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munne S. Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil Steril* 1999; 72: 837-44.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Tabanelli C, Trombetta C, Boudjema E. The role of preimplantation diagnosis for aneuploidies. *Reprod Biomed Online* 2002; 4 Suppl 3: 31-6.
- Gnainsky Y, Granot I, Aldo PB, Barash A, Or Y, Schechtman E, Mor G, Dekel N. Local injury of the endometrium induces an inflammatory response that promotes successful implantation. *Fertil Steril* 2010; 94: 2030-6.

- Goossens V, Traeger-Synodinos J, Coonen E, De Rycke M, Moutou C, Pehlivan T, Derks-Smeets IA, Harton G. ESHRE PGD Consortium data collection XI: cycles from January to December 2008 with pregnancy follow-up to October 2009. *Hum Reprod* 2012; 27: 1887-911.
- Greco E, Bono S, Ruberti A, Lobascio AM, Greco P, Biricik A, Spizzichino L, Greco A, Tesarik J, Minasi MG, Fiorentino F. Comparative genomic hybridization selection of blastocysts for repeated implantation failure treatment: a pilot study. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 457913.
- Guerif F, Bidault R, Gasnier O, Couet ML, Gervereau O, Lansac J, Royere D. Efficacy of blastocyst transfer after implantation failure. *Reprod Biomed Online* 2004; 9:630-6.
- Gutierrez-Mateo C, Colls P, Sanchez-Garcia J, Escudero T, Prates R, Ketterson K, et al. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertil Steril* 2011; 95: 953–8.
- Handyside AH, Wells D. Single nucleotide polymorphisms and next generation sequencing. In: Gardner DK, Sakkas D, Seli E, Wells D, editors. *Human gametes and preimplantation embryos: assessment and diagnosis*. New York: Springer Science Business Media; 2013: 135–46.
- Handyside AH. 24-chromosome copy number analysis: a comparison of available technologies. *Fertil Steril* 2013; 100: 595–602.
- Hardarson T, Hanson C, Lundin K, Hillensjö T, Nilsson L, Stevic J, Reisner E, Borg K, Wikland M, Bergh C. Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2008; 23: 2806-12.

- Hardy K, Martin KL, Leese HJ, Winston RM, Handyside AH. Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod* 1990; 5: 708-14.
- Harper J, Coonen E, De Rycke M, Fiorentino F, Geraedts J, Goossens V, Harton G, Moutou C, Pehlivan Budak T, Renwick P, Sengupta S, Traeger-Synodinos J, Vesela K. What next for preimplantation genetic screening (PGS)? A position statement from the ESHRE PGD Consortium Steering Committee. *Hum Reprod* 2010; 25: 821–3.
- Harper JC, Coonen E, De Rycke M, Harton G, Moutou C, Pehlivan T, Traeger-Synodinos J, Van Rij MC, Goossens V. ESHRE PGD Consortium data collection X: cycles from January to December 2007 with pregnancy follow-up to October 2008. *Hum Reprod* 2010; 25: 2685-707.
- Harper JC, Coonen E, Handyside AH, Winston RML, Hopman AHN, and Delhanty JDA. Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal, monospermic preimplantation human embryos.” *Prenatal Diagnosis* 1995, 15, 41–49.
- Harper JC, Harton G. The use of arrays in PGD/PGS. *Fertil Steril* 2010; 94: 1173–7.
- Harton GL, Harper JC, Coonen E, Pehlivan T, Vesela K, Wilton L; European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) PGD Consortium. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for fluorescence in situ hybridization-based PGD. *Hum Reprod* 2011; 26: 25-32.
- Hassold T, Chen N, Funkhouser J. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Annals of Human Genetics* 1980; 44, 151–78.
- Hassold T, Hunt P: To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 280-91.
- Hassold T, Hunt PA, Sherman S. Trisomy in humans: incidence, origin and etiology. *Curr Opin Genet Develop* 1993; 3: 398-403.

- Hellani A, Abu-Amero K, Azouri J, El-Akoum S. Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-aneuploidy screening. *Reprod Biomed Online* 2008; 17: 841-7.
- Hernández ER. What next for preimplantation genetic screening? Beyond aneuploidy. *Hum Reprod* 2009; 24: 1538–41.
- Herting AT, Rock J, Adams EC, Menkin MC. Thirty four fertilized human ova, good, bad and indifferent, recovered from 210 woman of known fertility. *Paediatrics* 1959; 23: 202-11.
- Jacobs PA, Hassold TJ. The origin of numerical chromosome abnormalities. *Adv Genet* 1995; 33: 101-33.
- Jansen RP, de Boer K. The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 145: 81–8.
- Johnson DS, Gemelos G, Baner J, Ryan A, Cinnioglu C, Banjevic M, Ross R, Alper M, Barrett B, Frederick J, Potter D, Behr B, Rabinowitz M. Preclinical validation of a microarray method for full molecular karyotyping of blastomeres in a 24 h protocol. *Hum Reprod* 2010; 25: 1066–75.
- Joris H, Nagy Z, Van de Velde H, De Vos A, Van Steirteghem A. Intracytoplasmic sperm injection: laboratory set-up and injection procedure. *Hum Reprod* 1998; 13 Suppl 1: 76-86.
- Kahraman S, Bahce M, Samli H, Imirzalioglu N, Yakin K, Cengiz G, Donmez E. Healthy births and ongoing pregnancies obtained by preimplantation genetic diagnosis in patients with advanced maternal age and recurrent implantation failure. *Hum Reprod* 2000; 15: 2003-7.
- Karimzadeh MA, Ayazi Rozbahani M, Tabibnejad N. Endometrial local injury improves the pregnancy rate among recurrent implantation failure patients



- Manor D, Kol S, Lewit N, Lightman A, Stein D, Pillar M, Itskovitz-Eldor J. Undocumented embryos: do not trash them, FISH them. *Hum Reprod* 1996; 11: 2502-6.
- Manor D, Stein D, Itskovitz-Eldor J: Preimplantation diagnosis by FISH: the Rambam experience. *J Assist Reprod Genet* 1998, 15: 308-9.
- Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, Vogel NE, Arts EG, de Vries JW, Bossuyt PM, Buys CH, Heineman MJ, Repping S, van der Veen F. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med* 2007; 357: 9-17.
- Mastenbroek S, Scriven P, Twisk M, Viville S, Van der Veen F, Repping S. What next for preimplantation genetic screening? More randomized controlled trials needed? *Hum Reprod* 2008; 23: 2626–8.
- Mastenbroek S, Twisk M, van der Veen F, Repping S. Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs. *Hum Reprod Update* 2011; 17: 454-66.
- Mastenbroek S1, Scriven P, Twisk M, Viville S, Van der Veen F, Repping S. What next for preimplantation genetic screening? More randomized controlled trials needed? *Hum Reprod* 2008; 23: 2626-8.
- May-Panloup P, Chretien MF, Malthiery Y, Reynier P. Mitochondrial DNA in the oocyte and the developing embryo. *Curr Top Dev Biol* 2007; 77: 51–83.
- McCoy RC, Demko Z, Ryan A, Banjevic M, Hill M, Sigurjonsson S, Rabinowitz M, Fraser HB, Petrov DA. Common variants spanning PLK4 are associated with mitotic-origin aneuploidy in human embryos. *Science* 2015; 348: 235-8.
- McFadden D, Jiang R, Langlois S, Robinson WP. Dispermy: origin of diandric triploidy. *Hum Reprod* 2002; 17: 3037-8.

- Mercader A, Garcia-Velasco JA, Escudero E, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Clinical experience and perinatal outcome of blastocyst transfer after coculture of human embryos with human endometrial epithelial cells: a 5-year follow-up study. *Fertil Steril* 2003; 80:1162-8.
- Mercader A, Herrer R, Valbuena D, et al: Cocultivo embrionario. *Rev Iberoamericana de Fertilidad* 1998; 4: 283-7.
- Mercader A, Simón C, Valbuena D, et al: Cocultivo. Cultivo de embriones humanos. En: *Reproducción Humana*. Remohí J, Pellicer A, Simón C, Navarro J. Madrid (ed) McGraw-Hill Interamericana de España, 2002: 469-74.
- Milán M, Cobo AC, Rodrigo L, Mateu E, Mercader A, Buendía P, Peinado V, Delgado A, Mir P, Simón C, Remohí J, Pellicer A, Rubio C. Redefining advanced maternal age as an indication for preimplantation genetic screening. *Reprod Biomed Online* 2010; 21: 649-57.
- Miller JF, Williamson E, Glue J, Gordon YB, Grudzinskas JG, Sykes A. Fetal loss after implantation. *Lancet* 1980; 2: 554-6.
- Mínguez Y, Rubio C, de los Santos MJ et al. Aspectos generales de la microinyección intracitoplasmática (ICSI). En: *Reproducción asistida*. Remohí J, Simón C, Pellicer A, Bonilla-Musoles F. Aravaca, McGraw Hill/Interamericana, 1996; 376-85.
- Mir P, Rodrigo L, Mateu E, Peinado V, Milán M, Mercader A, Buendía P, Delgado A, Pellicer A, Remohí J, Rubio C. Improving FISH diagnosis for preimplantation genetic aneuploidy screening. *Hum Reprod* 2010; 25: 1812-7.
- Mir P, Rodrigo L, Mercader A, Buendía P, Mateu E, Milán-Sánchez M, Peinado V, Pellicer A, Remohí J, Simón C, Rubio C. False positive rate of an array CGH platform for single-cell preimplantation genetic screening and subsequent clinical application on day-3. *J Assist Reprod Genet* 2013; 30: 143-9.

- Moutou C, Goossens V, Coonen E, De Rycke M, Kokkali G, Renwick P, SenGupta SB, Vesela K, Traeger-Synodinos J. ESHRE PGD Consortium data collection XII: cycles from January to December 2009 with pregnancy follow-up to October 2010. *Hum Reprod* 2014; 29: 880-903.
- Munné S, Chen S, Fischer J, Colls P, Zheng X, Stevens J, Escudero T, Oter M, Schoolcraft B, Simpson JL, Cohen J. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages. *Fertil Steril* 2005; 84: 331-5.
- Munné S, Cohen J. Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 842-55.
- Munné S, Fischer J, Warner A, Chen S, Zouves C, Cohen J, Referring Centers PGD Group. Preimplantation genetic diagnosis significantly reduces pregnancy loss in infertile couples: a multicenter study. *Fertil Steril* 2006; 85: 326–32.
- Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Velilla E, Walmsley R, Sadowy S, Cohen J, Sable D. Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 91–7.
- Munné S, Weier HUG, Grifo J, Cohen J. Chromosome mosaicism in human embryos. *Biol Reprod* 1994; 51: 373-9.
- Munne S, Wells D, Cohen J. Technology requirements for preimplantation genetic diagnosis to improve assisted reproduction outcomes. *Fertil Steril* 2010; 94: 408–30.
- Nicolaidis P, Petersen MB. Origin and mechanisms of nondisjunction in human autosomal trisomies. *Hum Reprod* 1998; 13: 313-9.
- Northrop LE, Treff NR, Levy B, Scott RT Jr. SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening demonstrates that cleavage-stage FISH poorly predicts aneuploidy in embryos that develop to morphologically normal blastocysts. *Mol Hum Reprod* 2010; 16: 590–600.



- Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. N Engl J Med 2001; 345: 1400-8.
- Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. Am J Obstet Gynecol 1975; 122: 262-3.
- Palermo G1, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet 1992; 340:17-8.
- Palermo GD, Cohen J, Alikani M, Adler A, Rosenwaks Z. Development and implementation of intracytoplasmic sperm injection. Reprod Fertil Dev 1995; 7: 211-7.
- Panagiotopoulou N, Karavolos S, Choudhary M. Endometrial injury prior to assisted reproductive techniques for recurrent implantation failure: a systematic literature review. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2015; 193: 27-33.
- Pang MG, Hoegerman SF, Cuticchia AJ, Moon SY, Doncel GF, Acosta AA, Kearns WG. Detection of aneuploidy for chromosomes 4,6,7,8,9,10,11,12,13,17,18,21, X and Y by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1999; 14: 1266-73.
- Pehlivan T, Rubio C, Rodrigo L, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Preimplantation genetic diagnosis by fluorescence “in situ” hybridization: clinical possibilities and pitfalls. J Soc Gynecol Investig 2003, 10: 315-22.
- Pehlivan T, Rubio C, Rodrigo L, Romero J, Remohi J, Simón C, Pellicer A. Impact of preimplantation genetic diagnosis on IVF outcome in implantation failure patients. Reprod Biomed Online 2003; 6: 232-7.
- Pellicer A, Rubio C, Vidal F, Mínguez Y, Giménez C, Egozcue J, Remohí J, Simón C. In vitro fertilization plus preimplantation genetic diagnosis in patients with recurrent



- Rodrigo L, Mateu E, Mercader A, Cobo AC, Peinado V, Milán M, Al-Asmar N, Campos-Galindo I, García-Herrero S, Mir P, Simón C, Rubio C. New tools for embryo selection: comprehensive chromosome screening by array comparative genomic hybridization. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 517125.
- Rodrigo L, Peinado V, Mateu E, Remohí J, Pellicer A, Simón C, Gil-Salom M, Rubio C. Impact of different patterns of sperm chromosomal abnormalities on the chromosomal constitution of preimplantation embryos. *Fertil Steril* 2010; 94: 1380-6.
- Rubio C, Simón C, Mercader A, Garcia-Velasco J, Remohí J, Pellicer A. Clinical experience employing co-culture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells. *Hum Reprod* 2000; 15 Suppl 6:31-8.
- Rubio C, Simón C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohí J, Pellicer A. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod* 2003, 18: 182-8.
- Rubio C, Rodrigo L, Pérez-Cano I, Mercader A, Mateu E, Buendía P, Remohí J, Simón C, Pellicer A. FISH screening of aneuploidies in preimplantation embryos to improve IVF outcome. *Reprod Biomed Online* 2005; 11: 497-506.
- Rubio C, Rodrigo L, Mercader A, Mateu E, Buendía P, Pehlivan T, Vilorio T, De los Santos MJ, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Impact of chromosomal abnormalities on preimplantation embryo development. *Prenat Diagn* 2007; 27: 748-56.
- Rubio C, Giménez C, Fernández E, Vendrell X, Velilla E, Parriego M, Rodrigo L; Spanish Interest Group in Preimplantation Genetics, Spanish Society for the study of the biology of reproduction. The importance of good practice in preimplantation genetic screening: critical viewpoints. *Hum Reprod* 2009; 24: 2045-7.
- Rubio C, Mercader A, Alamá P, Lizán C, Rodrigo L, Labarta E, Melo M, Pellicer A, Remohí J. Prospective cohort study in high responder oocyte donors using two

hormonal stimulation protocols: impact on embryo aneuploidy and development.  
Hum Reprod 2010; 25: 2290-7.

- Rubio C, Bellver J, Rodrigo L, Bosch E, Mercader A, Vidal C, De los Santos MJ, Giles J, Labarta E, Domingo J, Crespo J, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Preimplantation genetic screening using fluorescence in situ hybridization in patients with repetitive implantation failure and advanced maternal age: two randomized trials. *Fertil Steril* 2013; 99: 1400–7.
- Rubio C, Rodrigo L, Mir P, Mateu E, Peinado V, Milán M, Al-Asmar N, Campos-Galindo I, Garcia S, Simón C. Use of array comparative genomic hybridization (array-CGH) for embryo assessment: clinical results. *Fertil Steril* 2013; 99: 1044-8.
- Rubio C, Pehlivan T, Rodrigo L, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Embryo aneuploidy screening for unexplained recurrent miscarriage: a minireview. *Am J Reprod Immunol* 2005; 53: 159-65.
- Rubio C1, Rodrigo L, Mir P, Mateu E, Peinado V, Milán M, Al-Asmar N, Campos-Galindo I, Garcia S, Simón C. Use of array comparative genomic hybridization (array-CGH) for embryo assessment: clinical results. *Fertil Steril* 2013; 99: 1044-8.
- Ruiz-Alonso M, Blesa D, Díaz-Gimeno P, Gómez E, Fernández-Sánchez M, Carranza F, Carrera J, Vilella F, Pellicer A, Simón C. The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril* 2013; 100: 818-24.
- Sandalinas M, Márquez C, Munné S. Spectral karyotyping of fresh, non-inseminated oocytes. *Mol Hum Reprod* 2002; 8: 580-5.
- Santos TA, El Shourbagy S, St John JC. Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome. *Fertil Steril* 2006; 85: 584–91.

- Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Katz-Jaffe MG, Wells D. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertil Steril* 2010; 94: 1700–6.
- Scott RT Jr, Ferry K, Su J, Tao X, Scott K, Treff NR. Comprehensive chromosome screening is highly predictive of the reproductive potential of human embryos: a prospective, blinded, nonselection study. *Fertil Steril* 2012; 97: 870–5.
- Scott RT Jr, Upham KM, Forman EJ, Hong KH, Scott KL, Taylor D, et al. Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2013; 100: 697–703.
- Shapiro B, Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST. Dramatic declines in implantation and pregnancy rates in patients who undergo repeated cycles of in vitro fertilization with blastocyst transfer after one or more failed attempts. *Fertil Steril* 2001; 76: 538-42.
- Simón C, Bellver J. Scratching beneath 'The Scratching Case': systematic reviews and meta-analyses, the back door for evidence-based medicine. *Hum Reprod* 2014; 29: 1618-21.
- Simón C, Gimeno MJ, Mercader A, O'Connor JE, Remohí J, Polan ML, Pellicer A. Embryonic regulation of integrins beta 3, alpha 4, and alpha 1 in human endometrial epithelial cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2607-16.
- Simón C, Martín JC, Pellicer A. Paracrine regulators of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; 14: 815-26.
- Simón C, Mercader A, Garcia-Velasco J, Nikas G, Moreno C, Remohí J, Pellicer A. Coculture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2638-46.

- Simón C, Martín JC, Galan A, Valbuena D, Pellicer A. Embryonic regulation in implantation. *Seminars in Reproductive Endocrinology* 1999; 17:267-74.
- Simón C, Rubio C, Vidal F, Gimenez C, Moreno C, Parrilla JJ, Pellicer A. Increased chromosome abnormalities in preimplantation embryos after in-vitro fertilization in patients with recurrent miscarriage. *Reprod Fertil Dev* 1998; 1: 87-92.
- Simpson JL. What next for preimplantation genetic screening? Randomized clinical trial in assessing PGS: necessary but not sufficient. *Hum Reprod* 2008; 23: 2179-81.
- Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2004; 19: 2849-58.
- Steer C, Campbell S, Davies M, Mason B, Collins W. Spontaneous abortion rates after natural and assisted conception. *Br Med J* 1989, 299: 1317-8.
- Taylor A. ABC of subfertility. Making a diagnosis. *BMJ* 2003; 327: 494-7.
- Treff NR, Fedick A, Tao X, Devkota B, Taylor D, Scott RT Jr. Evaluation of targeted next-generation sequencing-based preimplantation genetic diagnosis of monogenic disease. *Fertil Steril* 2013; 99: 1377-84.
- Treff NR, Levy B, Su J, Northrop LE, Tao X, Scott RT Jr. SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening is significantly more consistent than FISH. *Mol Hum Reprod* 2010; 16: 583-9.
- Treff NR, Su J, Tao X, Levy B, Scott RT Jr. Accurate single cell 24 chromosome aneuploidy screening using whole genome amplification and single nucleotide polymorphism microarrays. *Fertil Steril* 2010; 94: 2017-21.

- Treff NR, Tao X, Ferry KM, Su J, Taylor D, Scott RT Jr. Development and validation of an accurate quantitative real-time polymerase chain reaction based assay for human blastocyst comprehensive chromosomal aneuploidy screening. *Fertil Steril* 2012; 97: 819–24.
- Uher P, Baborova P, Kralickova M, Zech MH, Verlinsky Y, Zech NH. Non-informative results and monosomies in PGD: the importance of a third round of re-hybridization. *RBM Online* 2009; 19: 539-46.
- Valbuena D, Cano F, Simón C. La ventana de la implantación. *Revista Iberoamericana de Fertilidad* 1996; XIII: 127-132.
- Van Steirteghem A. What next for assisted reproductive technology? A plea for an evidence-based approach. *Hum Reprod* 2008; 23: 2615–6.
- Vandervorst M, Liebaers I, Sermon K, Staessen C, De Vos A, Van de Velde H, Van Assche E, Joris H, Van Steirteghem A, Devroey P. Successful preimplantation genetic diagnosis is related to the number of available cumulusoocyte complexes. *Hum Reprod* 1998; 13: 3169-76.
- Vidal F, Giménez C, Rubio C, Simón C, Pellicer A, Santaló J, Egozcue J. FISH preimplantation diagnosis of chromosome aneuploidy in recurrent pregnancy wastage. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15: 310-3.
- Vlad M, Walker D, Kennedy RC. Nuclei number in human embryos co-cultured with human ampullary cells. *Hum Reprod* 1996; 11: 1678-86.
- Voullaire L, Collins V, Callaghan T, McBain J, Williamson R, Wilton L. High incidence of complex chromosome abnormality in cleavage embryos from patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril* 2007; 87: 1053-8.
- Wells D, Alfarawati S, Fragouli E. Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: microarrays and CGH. *Mol Hum Reprod* 2008; 14: 703–10.

- Wiemer KE, Cohen J, Amborski GF, Wright G, Wiker S, Munyakazi L, Godke RA. In-vitro development and implantation of human embryos following culture on fetal bovine uterine fibroblast cells. *Hum Reprod* 1989; 4: 595-600.
- Wiemer KE, Cohen J, Wiker SR, Malter HE, Wright G, Godke RA. Co-culture of human zygotes on fetal bovine uterine fibroblasts: embryonic morphology and implantation. *Fertil Steril* 1989; 52: 503-8.
- Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, Armstrong EG, Nisula BC. Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1988; 319:189-94.
- Wilton L, Voullaire L, Sargeant P, Williamson R, McBain J. Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure. *Fertil Steril* 2003; 80: 860–8.
- Wilton L. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in early human embryos: a review. *Prenat Diagn* 2002; 22: 512–8.
- Yang Z, Lin J, Zhang J, Fong WI, Li P, Zhao R, Liu X, Podevin W, Kuang Y. Randomized comparison of next-generation sequencing and array comparative genomic hybridization for preimplantation genetic screening: a pilot study. *Liu J12. BMC Med Genomics* 2015 8: 30.
- Yang Z, Liu J, Collins GS, Salem SA, Liu X, Lyle SS, et al. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Mol Cytogenet* 2012; 5: 24.
- Yeung TW, Chai J, Li RH, Lee VC, Ho PC, Ng EH. The effect of endometrial injury on ongoing pregnancy rate in unselected subfertile women undergoing in vitro fertilization: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2014; 29: 2474-81.



- Yin X, Tan K, Vajta G, Jiang H, Tan Y, Zhang C, Chen F, Chen S, Zhang C, Pan X, Gong C, Li X, Lin C, Gao Y, Liang Y, Yi X, Mu F, Zhao L, Peng H, Xiong B, Zhang S, Cheng D, Lu G, Zhang X, Lin G, Wang W. Massively parallel sequencing for chromosomal abnormality testing in trophectoderm cells of human blastocysts. *Biol Reprod* 2013; 88: 69.
- Zaragoza MV, Surti U, Redline RW, Millie E, Chakravarti A, Hassold TJ. Parental origin and phenotype of triploidy in spontaneous abortions: predominance of diandry. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1807-20.



## **8. AGRADECIMIENTOS**



***Dos caminos se bifurcaban en un bosque y yo,  
Yo tomé el menos transitado,  
Y eso hizo toda la diferencia.***

*Robert Frost-El Camino No Elegido*

Una tesis es como una historia, y esta tesis no es solo la historia de DPI en pacientes de fallo de implantación pero también de una chica Turca que salió de su país en busca de hacer lo que le apasiona sin imaginar que en aquella búsqueda encontraría las mejores personas que conocería en su vida y terminaría llamando a muchas familias....

A mis dos directores de la tesis, Carmen y Carlos, por su gran apoyo en todo el camino....A Carlos por su liderazgo científico y visión y por abrirme las puertas de lo mejor etapa de mi vida, por apoyarme siempre cuando lo necesitaba. A Mari Carmen por absolutamente todo.... Por hacerme 'un chica DPI' para siempre, por crear la familia DPI que tiene lo mejor de los dos mundos de ciencia y de amistad... Por guiar con ejemplo y por ser no solamente la mejor jefa del mundo pero también ser lo mejor persona que conozco. Por ser mi mentor, mi amiga y mi hermana....

Al Dr. Antonio Pellicer y al Dr. José Remohí, por su liderazgo y visión científico y su apoyo.

Al Dr. Juan Antonio García Velasco por introducirme a la familia IVI.

A todos los compañeros embriólogos y técnicos de los laboratorios de FIV y de Andrología de los IVIs, especialmente a mis mentores Amparo Ruiz, Gloria Calderón, M<sup>a</sup> José De los Santos, Pep Romero, Nicolás Prados, Yolanda Mínguez, Amparo Mercader, Ana Cristina Cobo, Nicolás Garrido, Lorena Rodrigo y Marcos Messeguer por ser tan buenos ejemplos de jefes, científicos y personas, por su gran amistad y apoyo en los momentos duros.

A mi gran familia DPI: las chicas DPI Emi, Vane, Arancha, Pili (por su gran apoyo para depositarla tesis) Támara, Sandra, Chiti, Maria Vera, Ana, Lucia, Bea, y el único chico DPI que estaba desde el principio; a Julio y los chicos que vinieron después

Miguel, Pere y Nasser. A los técnicos del equipo IGENOMIX; Asun, Mila (mi hermana española.), María Jesús, Tantra y Vicente.

Al Dr. Manolo Gil, que estaba desde el principio y aunque ya no está en este mundo siempre estará en nuestro corazón con su gran sonrisa como parte del equipo DPI..... Y a todo el equipo médico de todos los IVIs...

A todos los “fellows” que han ido pasando a lo largo de estos años con quien hemos compartido momentos muy especiales y quienes son ya amigos de toda la vida.

A Patricia Fadon por su gran apoyo en las correcciones de la tesis.

FIV es un trabajo de equipo en todos los sentidos y DPI más aun....

A todo el equipo humano IVI y IGENOMIX, desde recepción, a las consultas, a los laboratorios de andrología, de los laboratorios generales, de los quirófanos, de los departamentos de informática e internacionales, de los de limpieza y mantenimiento, dirección y administración....

A mis dos familias españoles; la familia Rubio y la familia Escobedo por siempre hacerme sentir como parte de la familia.

A María Carmen Escobedo por su gran corazón, su amistad, por ser mi hermana y por absolutamente todo....

A Miguel que siempre está en nuestra corazón con su gran sonrisa....Esperemos que la ciencia encuentra la curación completa para el cáncer pronto....

Por último, pero no menos importante para mi familia, para su eterno apoyo en todos los momentos duros. A mi marido por todas las cosas buenas en mi vida y a mis dos hijas Valencianas por ser la alegría sin fin y la inspiración en mi vida.

**A Todos**

**Muchas Gracias.....**



